

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA



AEROALÉRGENOS DE ORIGEN FÚNGICO

IMPLICACIÓN DE *ULOCLADIUM BOTRYTIS* EN LA HIPERSENSIBILIDAD
MEDIADA POR Ig E.
ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA Y REACTIVIDAD CRUZADA

TESIS DOCTORAL DE:

ANTONIO MORENO FERNÁNDEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**EDUARDO MARTÍNEZ NAVES
RICARDO PALACIOS PELÁEZ**

Madrid, 2013

©Antonio Moreno Fernández, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

MADRID



**Aeroalérgenos de origen fúngico:
Implicación de *Ulocladium botrytis* en la
hipersensibilidad mediada por Ig E.
Estandarización biológica y reactividad
cruzada.**

**Antonio Moreno Fernández
2012**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

FACULTAD DE MEDICINA

MADRID



**Aeroalérgenos de origen fúngico:
Implicación de *Ulocladium botrytis* en la
hipersensibilidad mediada por Ig E.
Estandarización biológica y reactividad
cruzada.**

Directores

Eduardo Martínez Naves

Ricardo Palacios Peláez

Doctorando:

Antonio Moreno Fernández

Madrid, 2012

El Dr. Eduardo Martínez Naves Profesor del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación titulado **“Aeroalérgenos de origen fúngico: Implicación de *Ulocladium botrytis* en la hipersensibilidad mediada por Ig E. Estandarización biológica y reactividad cruzada ”**, constituye la memoria que presenta D. Antonio Moreno Fernández para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid a cinco de noviembre de dos mil doce

VºBº

Fdo:

El Dr. Ricardo Palacios Peláez Profesor del Departamento de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado de Louisiana (LSUHSC)

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación titulado **“Aeroalérgenos de origen fúngico: Implicación de *Ulocladium botrytis* en la hipersensibilidad mediada por Ig E. Estandarización biológica y reactividad cruzada”**, constituye la memoria que presenta D. Antonio Moreno Fernández para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid a cinco de noviembre de dos mil doce

VºBº

Fdo: Dr.

*“A mis padres, que tanto han luchado para que sus hijos sean médicos;
y por supuesto a Carolina, mi amor, que me hace sentir completo.”*

Con estas líneas quiero rendir un merecido homenaje a todos aquellos que me han ayudado a desarrollarme como persona y especialmente a llevar a buen puerto este trabajo de investigación.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento por sus aportaciones a lo largo de mi vida.

Dr. Ricardo Palacios Peláez, Profesor del Departamento de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado de Louisiana, EEUU; Director General de Laboratorios DIATER, codirector de esta tesis y ante todo amigo. Por su infinita e impagable generosidad.

Dr. Eduardo Martínez Naves, Profesor del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, codirector de esta tesis. Por guiar la nave de mis estudios de doctorado durante diez años y sin cuyas aportaciones no hubieran alcanzado la excelencia que se pretende.

Dr. Fernando Pineda de la Losa, sin cuya labor y dedicación este trabajo no hubiera sido posible.

Dr. Javier Alcover Díaz, por sus valiosas contribuciones científicas.

D. Santos Pineda Gil, por sus facilidades para poder llevar a cabo este proyecto.

D. Ricardo Palacios Blanco, por su amistad, bondad y trabajo.

Dr. Angel Vallverdu Bonet y D^a Marina López Álvarez por su profesionalidad.

Profesores José Prieto y Diego Dámaso , el penúltimo eslabón.

Dra. María Rubio Sotés, antigua Jefa del Servicio de Alergología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Mi primer jefe. Una maestra en todos los sentidos y un modelo para todos.

Dr. Roberto Pelta Fernández, Médico Adjunto del Servicio de Alergología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, del que tanto aprendí y que tantas y tan buenas oportunidades me ofreció a cambio de nada.

Dra. Elena Alonso Lebrero, Médica Adjunta del Servicio de Alergología Infantil del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por su confianza en mí.

Dres. Zubeldia, Zapatero, Baeza, Tornero, Olalde, de Barrio y Herrero. Médicos Adjuntos del Servicio de Alergología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Todos me aportaron algo y es un privilegio haber trabajado con este excepcional grupo de profesionales, durante cuatro años, en dicho Hospital.

D^a Gema Serna García y D. Juan del Río Sánchez, Diplomados Universitarios en Enfermería del Centro de Especialidades Diagnóstico y Tratamiento de Tarancón, Cuenca; por su inestimable colaboración en este proyecto.

Al Dr. Jesús Moreno Fernández, mi hermano y mi mejor amigo. El mejor médico que jamás he conocido y del que estoy realmente orgulloso.

A D. Bernardo Fernández Moyano, mi abuelo, que con su vitalidad y ansia de conocimiento insaciable supone un ejemplo a seguir.

A Rafael, Carmen y Catalina, que siguen estando ahí y de los que tanto aprendí.

Al Dr. Juan Igor Molina Puente, por su amistad y por estar siempre en el mismo sitio.

Al Dr. Francisco Javier Ruíz Hornillos, por su amistad y por hacer siempre gala de valores como la lealtad y la honestidad.

Y a todos mis amigos, que a lo largo de mi vida me han aportado felices vivencias y me han permitido disfrutar con ellos.

Índice de abreviaturas y acrónimos

µg:	microgramo.	
µL:	microlitro.	
1.... n p	1.... n:	número del cromosoma en referencia al brazo largo p.
1.... n q	1....n:	número del cromosoma en referencia al brazo corto q.
Abs:	absorbancia.	
ABTS:	ácido 2,2-azino-di-(3 etilbenzotiazolin) sulfónico.	
ACF:	adyuvante completo de Freund	
AIF:	adyuvante incompleto de Freund.	
ALDH:	aldehído deshidrogenasa.	
AMPc:	adenosin monofosfato cíclico.	
ARN:	ácido ribonucleico.	
B:	población linfocitaria.	
BSA:	seroalbúmina bovina.	
BU:	unidad biológica.	
Ca:	calcio.	
CDC:	Control Diseases Center.	
CD ₂₃ :	receptor de baja afinidad para la Ig E (Fc ε RII).	
CD ₄ :	receptor de célula T para reconocimiento moléculas HLA clase II.	
cDNA	ácido desoxido ribonucleico complementario.	
cm:	centímetro.	
cm ² :	centímetro cuadrado.	
CPMP:	comité de la EMEA para evaluación de productos medicinales.	
Da:	daltons.	
DAG:	diacil glicerol.	
DMAB:	ácido 3 dimetilaminobenzóico.	
DNA:	ácido desoxido ribonucleico.	
DSS:	disuccinimidil suberato.	
ECP:	proteína catiónica del eosinófilo.	
EDTA:	ácido etilen-diamino-tetraacetico.	
ELISA:	enzimoinmunoensayo en placa de poliestireno (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).	
EMEA/EMA:	Agencia Europea para Evaluación de Medicamentos.	
Fig.	figura.	
Fc ε RI:	receptor de alta afinidad para la Ig E.	
Fc ε RII:	receptor de baja afinidad para la Ig E.	
g:	gramo.	
GM-GSF:	factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos.	
GTP:	guanosina trifosfato.	
h:	hora.	
H ₁4:	tipo de receptor para la histamina.	
H ₂ O:	agua.	
H ₂ O ₂ :	agua oxigenada.	
HCl:	ácido clorhídrico.	
HEP:	unidad histamino equivalente por prick.	
HR:	humedad relativa.	
HRP:	peroxidasa de rábano.	
HLA:	antigenos de leucocitos humanos.	
ICH:	conferencia internacional de armonización.	
IHR:	In house reference	

IFN γ :	interferón gamma.
Ig:	inmunoglobulina.
Ig:	Inmunoglobulina
IgE:	inmunoglobulina E.
IgG:	inmunoglobulina G.
IL - ...:	interleuquina.....
IPG	immobilized pH gradient
ITAM:	inmunoreceptor activación de tirosina.
IUIS:	International Union immunology Societies.
KCl:	cloruro potásico.
KDa:	kilodaltons.
Kg:	kilogramo.
KH ₂ PO ₄ :	fosfato potásico.
KU:	kilo unidades.
L:	litro.
LT.C., D., E...:	leucotrienos de clases C., D.,E..
LTP.	proteínas de transferencia de lípidos.
Lyn:	tirosina quinasa.
m ³ :	metro cúbico.
M:	molaridad.
mAb:	anticuerpo(s) monoclonal(es).
mA:	miliamperio.
mcg:	microgramos.
mg:	milígramo.
mm ² :	milímetros cuadrados.
mS:	mili Siemens.
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad.
min.:	minuto.
mL:	mililitro.
mM:	mili molar.
mm:	milímetro.
MOI:	multiplicidad de infección
N:	normalidad.
Na ₂ CO ₃ :	carbonato sódico.
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O:	fosfato disódico dihidratado.
NaCl:	cloruro sódico.
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O:	fosfato sódico monohidratado.
NaHCO ₃ :	bicarbonato sódico.
ng:	nanogramo.
nm:	nanometro.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
° C:	grados centígrados.
p/v:	peso / volumen.
PAF:	factor activador de plaquetas.
PBS:	tampón fosfato salino.
PBS-T:	solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v).
PBS-T-BSA:	solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v) y seroalbúmina bovina al 1% (p/v).
PG.....:	prostaglandina.
PI:	fosfatidil Inositol.
pI:	punto isoelectrico
PLA,C:	fosfolipasa A, C.
PM:	peso molecular.
PMSF:	phenylmethilsulfonyl fluoride.

PVDF:	difluoruro de polivinilideno.
r.p.m.:	revoluciones por minuto.
RAST:	enzimoinmunoensayo con fase sólida en discos de celulosa (<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>).
RNA:	ácido ribonucleico.
SDS:	dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.
SPT:	prueba cutánea (<i>Skin Prick Test</i>).
T:	población linfocitaria.
TA:	temperatura ambiente.
TBS:	tampón tris salino.
TEMED:	N, N, N',N'-tetrametil-etilendiamina.
TGF β	factor de crecimiento tumoral β .
T _h 1:	subpoblación de linfocito colaborador.
T _h 2:	subpoblación de linfocito colaborador.
T _h 3:	subpoblación de linfocito colaborador.
TNF α :	factor de necrosis tumoral alfa.
Treg:	subpoblación celular T. Célula T reguladora.
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano.
Tween-20:	polioxietileno-sorbitan monolaurato.
UI:	unidad internacional.
v/v:	volumen/volumen.
V:	voltios.
W:	watios.
X g:	fuerza centrífuga relativa; número de veces la aceleración de la gravedad.
YCP4:	flavoproteína alergénica.
YCP5:	flavoproteína alergénica

Indice de figuras

Figura 1: teoría higienista (Busse, 2002)	16
Figura 2 Activación linfocitaria. (Rang H.P., 2008)	18
Figura 3: Reacción inmediata (Valenta, 2002)	20
Figura 4: Reacción tardía (Valenta, 2002)	20
Figura 5: Estructura del receptor de alta afinidad de la IgE:FcεRI	22
Figura 6: liberación mediadores del mastocito	24
Figura 7: Fase tardía. Liberación mediadores (Marsha Wills-Karp, 2001)	25
Figura 8: Paneles con alérgenos para ensayos microarrays (Hiller, 2002)	28
Figura 9: cultivos y morfología de <i>Alternaria alternata</i>	35
Figura 10: cultivos y morfología de <i>Aspergillus fumigatus</i>	37
Figura 11: cultivos y morfología de <i>Cladosporium herbarum</i>	38
Figura 12: Cultivos y morfología de <i>Penicilium chrysogenum</i>	39
Figura 13: Cultivos y morfología de <i>Stemphylium botryosum</i>	39
Figura 14: Cultivos y morfología de <i>Fusarium</i>	40
Figura 15: Cultivos y morfología de <i>Botrytis sp</i>	40
Figura 16: Cultivos y morfología de <i>Ulocladium botrytis</i>	41
Figura 17: Cultivos y morfología de <i>Rhizopus</i>	41
Figura 18: Cultivos y morfología de <i>Mucor mucedo</i>	41
Figura 19: Cultivos y morfología de <i>Trichophyton sp</i>	42
Figura 20: Cultivos y morfología de <i>Candida sp</i>	42
Figura 21: Cultivos y morfología de <i>Stachybotrys chartarum</i>	44
Figura 22: Esquema de uso para detección de <i>Stachybotrys chartarum</i>	71
Figura 23. Composición de la tira del test de liberación de histamina	76
Figura 24: Antigenograma de extractos alérgenos de hongos.	81
Figura 25: Antigenograma de extractos alérgenos de hongos	81
Figura 26. Ejemplo de lugares de recogida de muestras domiciliarias	83
Figura 27. Cultivo de la muestra en Agar Sabouraud	83
Figura 28: Inmunotransferencia (immunoblotting) del extracto alérgico de <i>Ulocladium botrytis</i>	88
Figura 29: DOT blot;	89
Figura 30: alergograma de extractos alérgenos de hongos vs pool de pacientes seleccionados y vs control negativo	90
Figura 31: alergograma de extractos alérgenos de hongos vs pool de pacientes seleccionados y vs control negativo	91
Figura 32: ELISA inhibición del extracto de <i>Ulocladium botrytis</i> versus <i>Ulocladium</i> , <i>Alternaria alternata</i> y <i>Stemphylium botryosum</i>	92
Figura 33: ELISA inhibición del extracto de <i>Ulocladium botrytis</i> versus <i>Ulocladium botrytis</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Cladosporium herbarum</i>	93
Figura 34 Inhibición de la Inmunotransferencia con el “pool” de sueros de los pacientes seleccionados en condiciones reductoras y no reductoras:	94
Tabla 13. Determinación de la liberación de histamina de los extractos de <i>Ulocladium botrytis</i> y Alt a 1	95
Figura 36. ELISA cuantificación de Alt a 1 del extracto de <i>Alternaria alternata</i> , <i>Ulocladium botrytis</i> , <i>Stemphylium botryosum</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> y <i>Penicilium notatum</i>	96
Figura 37 Electroforesis en 2D del extracto de <i>Ulocladium botrytis</i>	97
Figura 38. Inmunotransferencia en 2D del extracto de <i>Ulocladium botrytis</i>	97
Figura 39. Descripción de la proteína identificada (fuente Mascot: http://www.matrixscience.com/)	99

Índice de tablas

Tabla 1 : Cromosomas y principales genes involucrados en la atopia	21
Tabla 2: Subpoblaciones de mastocitos humanos	24
Tabla 3. Fuentes estudiadas	50
Tabla 4: Receta de Liofilización.....	51
Tabla 5: Estándares de pesos moleculares.....	55
Tabla 6: Niveles de Ig E específica y clases.....	66
Tabla 7: Mezcla de reacción molecular de la biotin-7 NHS.....	68
Tabla 8: patrones analíticos de los extractos alergénicos de hongos	80
Tabla 9. Descripción clínica de los pacientes.	82
Tabla 10. Valores de áreas de pápula e Ig E específica <i>Ulocladium botrytis</i>	85
Tabla 11. Valores de áreas de pápula e Ig E específica <i>Ulocladium botrytis</i> ...	86
Tabla 12. Cálculo del valor HEP de <i>Ulocladium botrytis</i>	87
Tabla 13. Determinación de la liberación de histamina de los extractos de <i>Ulocladium botrytis</i> y Alt a 1	95
Tabla 14. Resultados de espectrometría de masas para la proteína con capacidad fijadora de <i>Ulocladium botrytis</i> (alérgeno ortólogo de Alt a1)	98

Indice general

I: INTRODUCCION	15
1. ALERGIA	166
1.1 Definición y mecanismos:	16
1.2 Hipersensibilidad inmediata	17
1.2.1 Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata	18
1.2.2 La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata	20
1.2.3 El receptor de la Inmunoglobulina E:	22
1.2.4 Las células involucradas en la hipersensibilidad inmediata	23
1.2.4.1 Mastocitos	23
1.2.4.2 Basófilos	25
1.2.4.3 Eosinófilos	25
1.3 Alérgenos. Origen y obtención	26
1.4 Diagnóstico en alergia	27
2. LOS HONGOS	28
2.1 Biología de los hongos:	28
2.2 Clasificación y características principales:	29
3. LOS HONGOS COMO ALERGENOS	31
3.1 Aerobiología de los hongos:	31
3.2 Diagnostico e inmunoterapia en la alergia a hongos:	33
4. Alérgenos de hongos	34
4.1 Género <i>Alternaria</i>	35
4.2 Género <i>Aspergillus</i>	36
4.3 Género <i>Cladosporium</i>	37
4.4 Género <i>Penicillium</i>	38
4.5 Género <i>Stemphylium</i>	39
4.6 Género <i>Fusarium</i>	40
4.7 Género <i>Botrytis</i>	40
4.8 Género <i>Ulocladium</i>	40
4.9 Género <i>Rhizopus</i>	41
4.10 Género <i>Mucor</i>	41
4.11 Género <i>Trichophyton</i>	41
4.12 Género <i>Candida</i>	42
5. REACTIVIDAD CRUZADA	42
6. ALERGENOS FUNGICOS EMERGENTES: <i>Stachybotrys chartarum</i>	44
6.1 Micotoxicosis	46
6.2 Enfermedades alérgicas	46
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIALES Y METODOS	49
1. OBTENCION Y PROCESADO DE LA FUENTE ALERGÉNICA	50

1.1 Selección de las fuentes de sensibilización fúngica	50
1.2 Homogeneización	50
1.3 Extracción	50
1.4 Filtración y diálisis	50
1.5 Estabilización	51
1.5.1 Determinación de parámetros analíticos	51
1.5.1.1 Humedad relativa:	51
1.5.1.2 Contenido proteico:	52
2 ANTIGENOGRAMAS Y ALERGOGRAMAS	52
2.1 Determinación de pesos moleculares. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)	52
2.1.1 Descripción de la SDS PAGE:	52
2.1.1.1 Tampones y soluciones	52
2.1.1.2 Montaje de las placas:	53
2.1.1.3 Preparación de los geles: Sistema discontinuo	53
2.1.1.4 Preparación de las muestras:	54
2.1.1.5 Condiciones electroforéticas:	54
2.1.1.6 Tinción:	54
2.1.1.7 Determinación de Pesos Moleculares:	55
2.1.2 Electroforesis en 2D	56
2.2 Transferencia de bandas proteicas, separadas por electroforesis a membranas inmovilizantes. Western blot y Western blot inhibición... ..	58
2.2.1 Descripción. Inmunotransferencia (Western blot)	58
2.2.2 Método de transferencia semiseco	58
2.2.2.1 Tinción de membranas de PVDF transferidas: directa	59
2.2.2.2 Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible	60
2.2.3 Inmunodetección de proteínas transferidas a PVDF.	60
2.3 Evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección	62
3. COMPORTAMIENTO DE LOS ALERGENOS	62
3.1 ELISA (Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay)	63
3.1.1 Cuantificación de Alt a1. ELISA doble sándwich	63
3.1.2 ELISA inhibición	64
3.2 Cuantificación de los niveles de IgE específica	66
3.2.1 Biotinilización de extractos alergénicos	67
3.2.2 Unión de proteínas marcadas con biotina a fases solidas Estreptavidina InmunoCAP y determinación de la Ig E específica mediante sistema automatizado UniCAP 100®	69
4 ESTANDARIZACION BIOLOGICA	69
4.1 Eficacia diagnóstica	69
4.2 Pruebas cutáneas	69
4.3 Pacientes	70
5. CARGA ALERGENICA FUNGICA	70
6. DOT blot	71
7. TEST DE LIBERACIÓN DE HISTAMINA	73

8. IDENTIFICACION DE ALERGENOS. ANALISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS	76
IV RESULTADOS.....	78
1. SELECCIÓN DE ESPECIES DE HONGOS:	79
2. PERFIL ANALÍTICO DE LOS EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE HONGOS:	79
3. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE HONGOS:	80
3.1 Condiciones no reductoras:.....	80
3.2 Condiciones reductoras:	81
4. SELECCIÓN DE ESPECIE DE MAYOR PREVALENCIA:	82
5. ESTANDARIZACION BIOLOGICA:	84
6. PERFILES ALERGÉNICOS DE LOS EXTRACTOS DE HONGOS:	88
7. REACTIVIDAD CRUZADA	92
8. LIBERACIÓN DE HISTAMINA:.....	95
9. CUANTIFICACION Alt a 1.....	96
10. DETECCION ALÉRGENOS ORTÓLOGOS	966
V: DISCUSION.....	100
VI: CONCLUSIONES.....	105
VII: BIBLIOGRAFIA.....	107

I. INTRODUCCION

1. ALERGIA

1.1 Definición y mecanismos:

Las enfermedades alérgicas representan una de las principales patologías que afectan a la salud de la población indiscriminadamente del sexo, raza y edad. En la actualidad se considera que al menos 150 millones de personas presentan problemas alérgicos (Datamonitor, 2011). En 1997 Romagnani consideró que se había producido un considerable incremento en su incidencia en las sociedades industrializadas durante los últimos 30 años, estimando que al menos un 20% de la población mundial era susceptible de padecer dicha enfermedad (Romagnani, 1997). Cerca del 25% de los pacientes alérgicos padecen asma, con un coste anual estimado en Estados Unidos cercano a los 6.000 millones de \$ USA (Smith, 1997). Estos hechos incentivan, la investigación de los mecanismos de la enfermedad, así como el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que contribuyan a fomentar la investigación básica y clínica (von Hertzen, 2000).

La asociación existente entre la genética y un elevadísimo número de patologías no escapa al grupo de las enfermedades alérgicas, siendo clara la relación en dolencias como el asma (Melen, 2012). Numerosos estudios (Meyers 2010) ponen de manifiesto el componente genético que acompaña a la enfermedad, aunque muchas veces, estos factores genéticos no explican su creciente incidencia. Por ello, se han desarrollado estudios epidemiológicos en diferentes grupos poblacionales para intentar relacionar causa y efecto. Estos estudios parten de la premisa de que los responsables de dicho crecimiento podrían ser debidos a cambios medioambientales (Sood, 2012) alteraciones feto-maternas, estilo de vida, dieta, y todos ellos en la denominada teoría higienista (Folkerts, 2000), cuya base es que la expresión de las subclases de linfocitos T helper (Th_1 y Th_2) se encuentra influenciada por los factores ambientales induciendo un desequilibrio hacia la subclase Th_2 en la población alérgica.

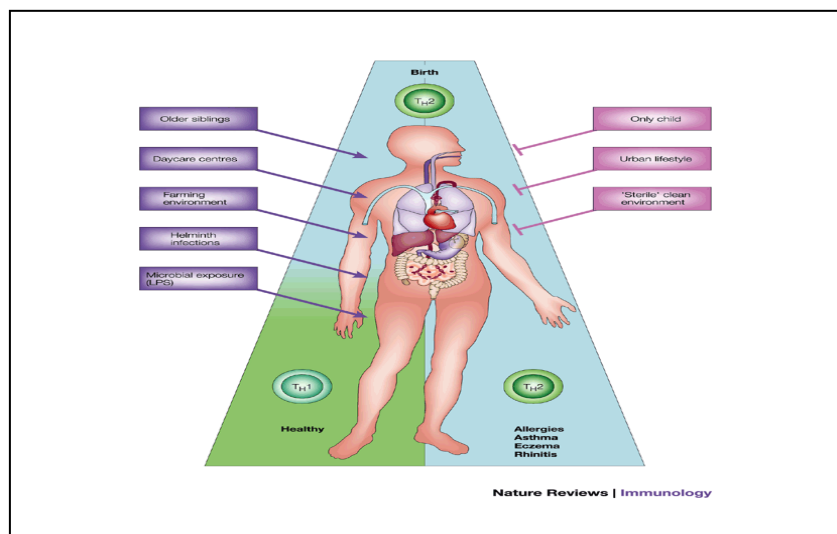


Figura 1: teoría higienista (Busse, 2002)

La aún más reciente teoría de Palm (Palm, 2012), preconiza que la respuesta alérgica del organismo es muy similar a la que el propio organismo genera, tras la inoculación de un veneno por un animal o en una infección por un parásito. La subclase Th₂ es la primera línea de defensa tras el contacto, por lo que se entiende la rapidez y severidad del mecanismo de la respuesta alérgica, como puede ser una reacción anafiláctica, dado que cuando un veneno penetra en el organismo, el tiempo de reacción y la contundencia de la respuesta son vitales. De éste modo se explicaría que la alergia es un mecanismo que la evolución ha mantenido, sin embargo no existe evidencia que demuestre que los individuos no alérgicos se encuentren menos protegidos que los alérgicos frente a parásitos o mordeduras venenosas.

1.2 Hipersensibilidad inmediata

Uno de los mecanismos de reacción más poderosos del sistema inmunitario es la estimulación mediada por la IgE de los mastocitos tisulares y de sus homólogos circulantes, los basófilos sanguíneos (Wills-Karp y cols., 2001). Cuando se produce un entrecruzamiento entre un antígeno y ésta clase de anticuerpos asociados a la superficie de las células, se produce una inmediata activación de las mismas, que conduce a la liberación de los mediadores almacenados en sus gránulos, los cuales generan en términos generales:

- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Vasodilatación.
- Contracción del músculo liso bronquial y visceral.
- Inflamación local

Esta reacción es conocida como “hipersensibilidad inmediata” (Noon, 1911) y por sus importantes repercusiones patológicas, que en su forma más extrema, sistémica conocida como “anafilaxia”, conllevan a una contracción de la vía respiratoria, hasta el punto de producir la parada cardio-respiratoria. Es característico también de la reacción de hipersensibilidad inmediata, que entre las 2 y 4 horas posteriores a la degranulación de mastocitos y basófilos, se produzca una reacción denominada como “fase tardía” (Mudde y cols., 1990), caracterizada por un infiltrado inflamatorio de eosinófilos, basófilos, neutrófilos y linfocitos; que conducen, tras reiteradas repeticiones a una lesión tisular.

Los individuos que tienden a producir anticuerpos de la clase IgE, en respuesta a diferentes antígenos ambientales y que presentan respuestas de hipersensibilidad inmediata, se denominan “atópicos”.

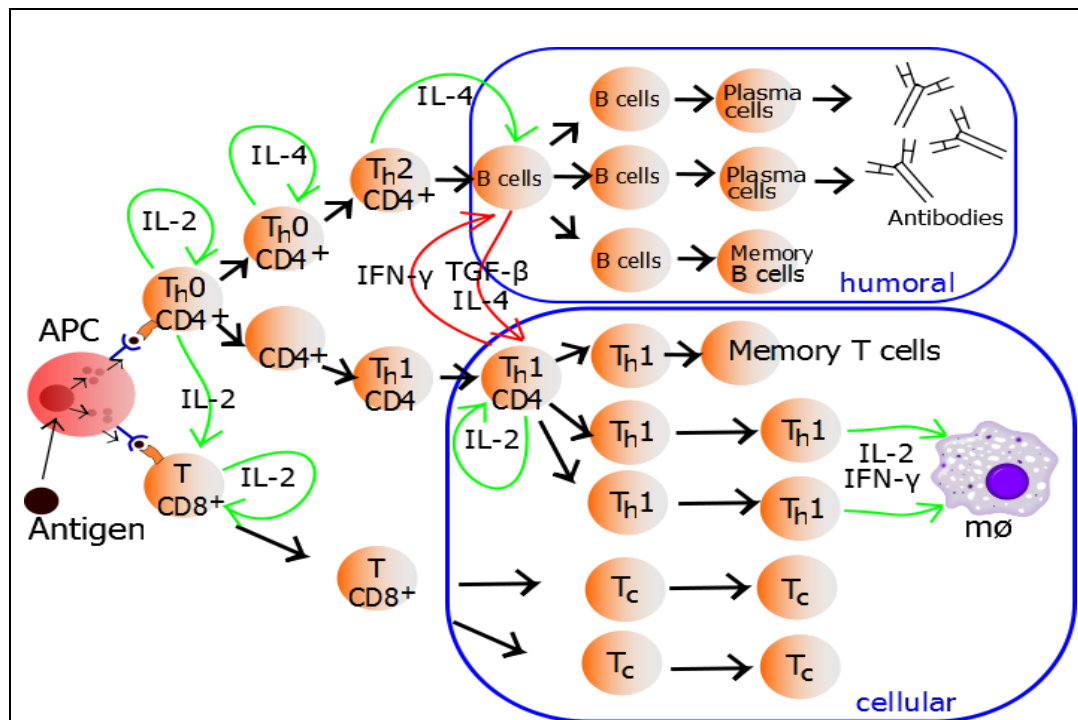


Figura 2 Activación linfocitaria. (Rang H.P., 2008)

1.2.1 Secuencia de acontecimientos en las reacciones de hipersensibilidad inmediata

La respuesta alérgica mediada por Ig E requiere de una serie de interacciones moleculares y celulares entre células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y monocitos), linfocitos T (subtipos T supresores y T helper: Th₁, Th₂ y Treg) y linfocitos B. Las células presentadoras de antígenos endocitan y fragmentan los antígenos para poder presentarlos, en forma de pequeños péptidos (denominados epítopos T) asociados a moléculas de clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T.

En individuos alérgicos el contacto con un antígeno, generalmente de naturaleza proteica, que habitualmente recibe el nombre de “alérgeno” (Wahn y cols., 1997), induce la estimulación de las células T CD4⁺, que representan el 60% de las células T circulantes y que disponen de receptores para los complejos epítomos T-MHC de clase II, que inducen su proliferación y la liberación de citoquinas y su ulterior transformación en células T efectoras o “helper”, denominadas Th₂ (Constant y cols., 2000). Estas células Th₂ producen y liberan citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 y mínima o ausencia de IFN γ (Grunewald y cols., 1998), así como señales mediadas por contacto, que inducen la diferenciación de células B específicas del antígeno, en células productoras de IgE específica del antígeno. En individuos sanos la respuesta de las células T CD4⁺ conduce a una elevada síntesis de IFN γ (potente antagonista de la IL-4).

Sin embargo se han descrito linfocitos T CD4⁺ heterogéneos como los denominados Th0 caracterizados por la síntesis de elevadas cantidades de IL-4 e IFN γ y otra familia conocida como Treg con capacidad de suprimir la

respuesta inmune y que presentan fenotipos diferentes. La comparación entre las células CD4⁺CD25⁺ Treg de individuos sanos y de individuos atópicos muestran que las células Treg de los individuos atópicos son menos efectivas en la supresión de las células CD4⁺CD25⁺ (Ling et al 2004 y Bellinghausen et al 2005) y la proporción de células Treg periféricas productoras de IL-10 alérgeno específica de los individuos alérgicos es más elevada que la de células Th₂, cuando se comparan con individuos no alérgicos (Akdis et al 2004)

Del concurso de estas interacciones, la IgE producida por los plasmocitos circula por el organismo, disponiendo de una vida media de 2 – 3 días y una concentración normal < 80 UI/mL, que se fija a receptores específicos de alta afinidad para el Fcε de la cadena pesada de la IgE, denominados FcεRI (Turner y Kinet, 1999) y presentes en la superficie de los basófilos sanguíneos circulantes y de los mastocitos de diversos tejidos, en los que se puede mantener hasta 15 días.

La reintroducción o un ulterior contacto con el mismo antígeno, induce su fijación por puenteo o entrecruzamiento con dos ó más moléculas de IgE específica, a través de sus Fab, en la superficie de mastocitos y basófilos (Saini y cols., 2000). El entrecruzamiento inicia una señal de transducción en las células, que conduce a su degranulación y liberación de mediadores preformados al exterior de las mismas, así como a la síntesis y liberación de otros mediadores, que son los responsables de las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas de la hipersensibilidad.

Algunos de los mediadores, inducen una acción inmediata sobre la musculatura lisa y vascular, mientras que otros mediadores estimulan la atracción y acumulo de leucocitos y linfocitos, que originan una acción retardada

La hipersensibilidad inmediata o alergia, puede considerarse de éste modo y en forma simplificada, como una enfermedad dependiente de células Th₂; ya que estas células producen IL-4; citoquina necesaria para la síntesis de IgE, así como de la IL-5 que estimula la activación del eosinófilo patrón común en los procesos inflamatorios y que es característico de muchas patologías alérgicas (Ying, 1997). Este tipo de reacción es diferente de la hipersensibilidad retardada, una reacción inmunitaria mediada por células T CD8⁺ y CD4⁺ Th₁, así como macrófagos, en las que los anticuerpos no presentan un papel protagonista.

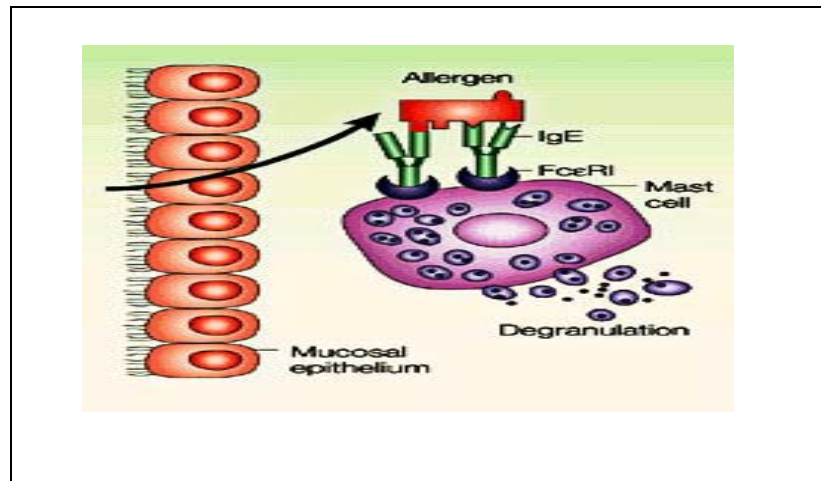


Figura 3: Reacción inmediata (Valenta, 2002)

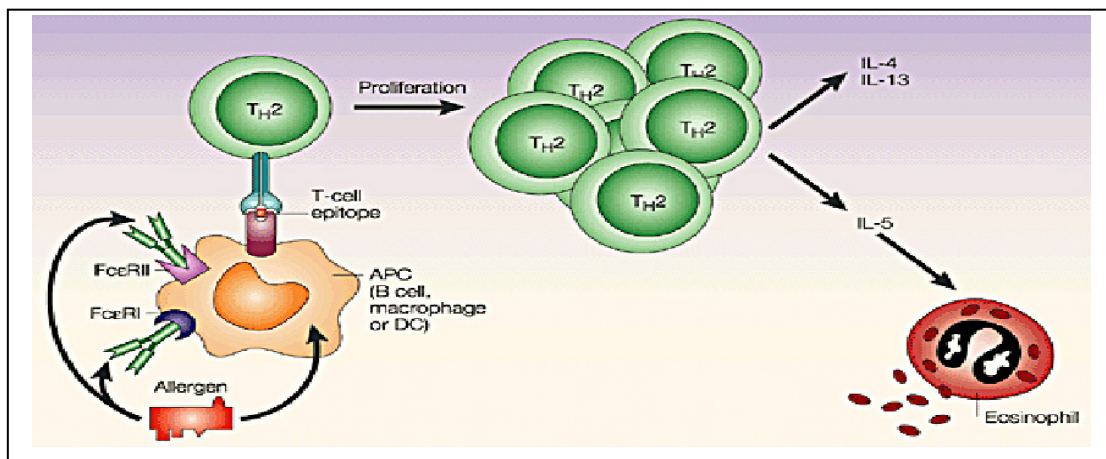


Figura 4: Reacción tardía (Valenta, 2002)

1.2.2 La Inmunoglobulina E en la hipersensibilidad inmediata

La IgE es el isotipo de anticuerpos que contiene la cadena pesada ϵ . Circula libremente, como anticuerpo bivalente en concentraciones inferiores a 1 pg/mL. En condiciones patológicas, como las infecciones por helmintos y la atopía, ésta concentración puede incrementarse hasta por encima de los 1.000 pg/mL. Su síntesis depende exclusivamente de la activación de las células T helper CD4⁺ y concretamente de la subpoblación de células Th₂ y de la secreción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Abbas y cols., 1991).

Los individuos atópicos, contienen en circulación además de una mayor cantidad de células T secretoras de IL-4, un incremento en su capacidad de síntesis, que en las personas no atópicas.

La base genética de la predisposición a sintetizar IgE, se encuentra influenciada por varios genes (Potaczek, 2012), mediante un probable patrón multigénico, de transmisión claramente autosómica, que involucra entre otros los siguientes cromosomas:

Cromosoma	Mediadores de atopia
1q23	IgE total
2q12	Eosinófilos
2q33	CD28: actividad células T
3p24.2p22	Receptor de quimiocinas
4q35	Factor regulador de interferón
5q23-q33	IL-4 IL-13, IL-3, IL-5, IL-9; factor estimulador de colonias; CD14: ligando lipopolisacáridos bacterianos
6p21.1-p23	TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
7p15.2	Ag HLA clase II
9q24	Eosinofilia. IL-33, ligando IL-1
11q13	Receptor de células T; IL-6
12q14-q24.23	Cadena β del recepto IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI- β)
13q14.3	Interferón gamma (IFN- γ) factor de células madre
14q32	Cadena pesada IgG
16p12.1	Receptor de células α/δ
17p11.1-q11.2	Receptor IL-4
17q-12, 17q21	Proteína transmembranaria ligada al retículo endoplásmico
19q13	Receptor de quimiocinas
20p13	Metaloproteasa
Xq28-Xq28-q29	CD22: células B maduras. Receptor de IL-9
HLA: complejo mayor de histocompatibilidad; Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina.	

Tabla 1 : Cromosomas y principales genes involucrados en la atopia
(Adaptado de F. Muños López: *Pediatrics, Down's syndrome and allergic disease.*
Rev Med Int Sindr Down. Volme 15:8-13. September 2011)

Las manifestaciones patológicas de la atopia, pueden presentarse en distinto grado en los miembros de una misma familia, pero siempre con el patrón común de disponer de elevadas concentraciones plasmáticas de IgE, en relación con la media normal (Feijen, 2000).

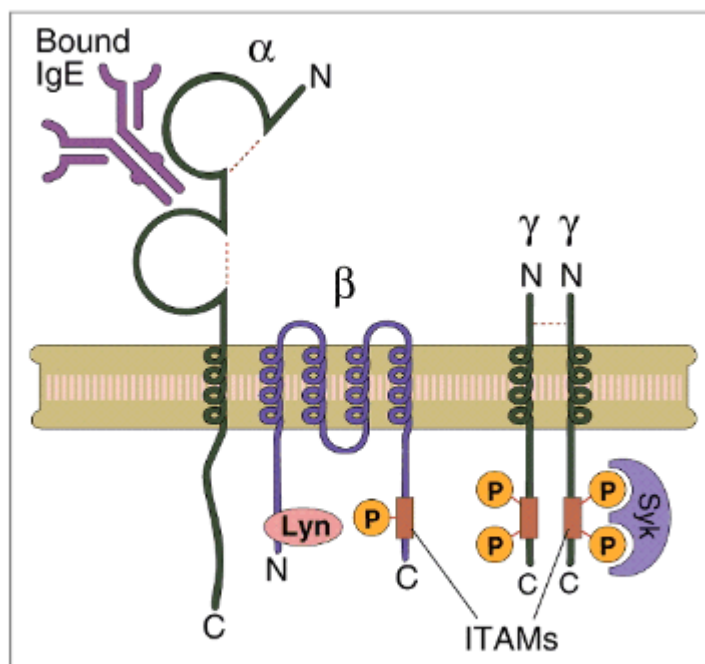
De esta forma el asma, una de las manifestaciones clínicas mas importantes del proceso alérgico, que se caracteriza por una hiperreactividad de las vías respiratorias provocada por una obstrucción de las mismas que se encuentra asociada a la región cromosómica ADAM 33 (Van Eerdewegh y cols., 2002) y al cromosoma 20p13 (Jongepier y cols., 2004)

Es patrón común, asociado a la heredabilidad, el incremento de la concentración de IgE específica para ciertos antígenos o alérgenos, lo cual presupone la implicación de determinados alelos del MHC de clase II.

1.2.3 El receptor de la Inmunoglobulina E:

Los efectos biológicos de la IgE en la hipersensibilidad inmediata, están mediados por la expresión de un receptor para el Fc de elevada afinidad de la cadena pesada ϵ ; que se denomina Fc ϵ RI y que encontramos en forma constitutiva en los mastocitos y en los basófilos (Bieber, 1992); aun cuando también han sido descritos receptores Fc ϵ RI en células de Langerhans epidérmicas, macrófagos dérmicos, monocitos y eosinófilos activados; desconociéndose su funcionalidad (Bieber, 1992).

La constante de disociación (K_d) que presenta el Fc ϵ RI para la IgE es de aproximadamente 1×10^{-10} M. Es por ello, que aun cuando la concentración de IgE es muy baja ($1 \mu\text{g/mL}$ ó 5×10^{-10} M); es sin embargo lo suficientemente elevada para permitir la ocupación de los receptores Fc ϵ RI. (Nag, 2010)



Copyright © 2003, Elsevier Science (USA). All Rights Reserved.

Figura 5: Estructura del receptor de alta afinidad de la IgE:Fc ϵ RI

Conocemos desde hace años (Garman, 1998) que cada molécula Fc ϵ RI está compuesta por 3 subunidades transmembranas diferentes, estando perfectamente caracterizadas cada una de dichas subunidades (Espinoza, 2012):

- Cadena α : que permite la expresión del receptor en la superficie de la célula.

- Cadena β : que atraviesa 4 veces la membrana.
- Cadena γ : 2 cadenas homólogas a la cadena ξ del complejo receptor para el antígeno de las células T.

La porción extracelular amino terminal de la cadena α contiene 2 dominios tipo Ig, que conforman el lugar de unión para la IgE y que es homólogo a los lugares de unión a la IgG de los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII. En los humanos la expresión habitual del receptor es $\alpha\gamma_2$, sin la cadena β (Blank, 1989).

La cadena β , contiene un único lugar de activación del inmunoreceptor vía tirosina, en el extremo carboxi terminal citoplasmático, denominado ITAM. Las dos cadenas polipeptídicas γ , se encuentran unidas por puentes disulfuro y la porción citoplasmática de cada cadena γ contiene un ITAM. Esta cadena γ , sirve como subunidad común para los Fc γ RI y Fc γ RIII (Kinet, 1988).

La expresión de receptores Fc ϵ RI, está regulada en mastocitos y basófilos por la IgE y la IL-4 en forma positiva (Paul y cols., 1993), lo que representa un mecanismo de amplificación de la respuesta inmunitaria en las infecciones parasitarias y en la hipersensibilidad inmediata.

Otro receptor de la IgE es el Fc ϵ RII; una proteína formada por una única cadena transmembranaria, relacionada con las lectinas de mamíferos de tipo C, cuya afinidad por la IgE es 1.000 veces menor que el Fc ϵ RI. En la actualidad se han descrito 2 isoformas diferentes:

- Fc ϵ RIIA: específica de las células B.
- Fc ϵ RIIB ó CD23: cuya expresión es inducida en las células B, algunas células T, macrófagos, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, plaquetas, monocitos y eosinófilos, por la IL-4.

En la actualidad las funciones del Fc ϵ RII están relacionadas con la disminución de la respuesta a IgE (Yu y cols, 1994; Mudde y cols, 1995)

1.2.4 Las células involucradas en la hipersensibilidad inmediata

1.2.4.1 Mastocitos

Los mastocitos derivan de progenitores presentes en la médula ósea (Costa y cols., 1997), que a través de la circulación, migran a los tejidos periféricos, como células inmaduras y se diferencian "in situ". Los mastocitos maduros se encuentran preferentemente cerca de los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, por debajo del epitelio y también se encuentran presentes en los órganos linfoides. Microscópicamente tienen una variedad de formas, siendo común el núcleo redondeado y la presencia de gránulos citoplasmáticos, que contienen proteoglicanos ácidos, que se fijan a colorantes básicos, estando los mismos limitados por una membrana y cuerpos lipídicos.

En la actualidad hay descritas dos subpoblaciones de mastocitos (Irani y Cols, 1986; Weidner y Austen, 1990), que se diferencian por su localización anatómica, contenido de los gránulos y acción biológica de sus mediadores.

	Población 1	Población 2
Características	Tejido conjuntivo	Mucosos
Localización	Piel Submucosa intestinal	Espacio alveolar Mucosa intestinal
Dependencia en desarrollo del fenotipo de células T	No	Si
Contenido de los gránulos	Proteasas neutras: Tryptasa Quimasa Carboxipeptidasa Catepsina G	Proteasa mayor: Tryptasa

Tabla 2: Subpoblaciones de mastocitos humanos

Aunque no se conoce completamente el significado fisiopatológico de estas subpoblaciones (Galli y cols., 1999), es probable que los mastocitos mucosos estén implicados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata dependiente de las células T y la IgE, con afectación de vías respiratorias, como el asma y que los mastocitos del tejido conjuntivo es probable que medien reacciones cutáneas pápulo-eritematosas y procesos vasculares agudos, inducidos por estímulos no inmunológicos.

Los mastocitos también pueden activarse directamente por varias sustancias, como las anafilotoxinas derivadas del complemento y especialmente el C5a, que se unen a receptores específicos de los mismos y estimulan la degranulación de la subpoblación del tejido conectivo, pero no de la subpoblación pulmonar.

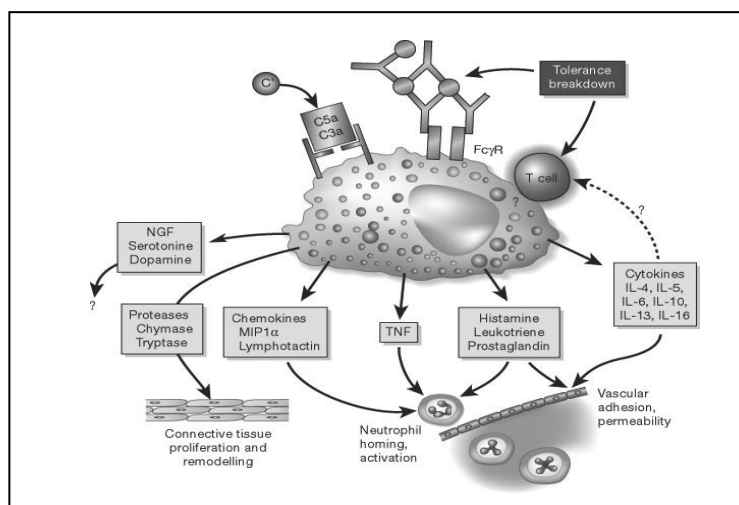


Figura 6: liberación mediadores del mastocito

1.2.4.2 Basófilos

Como otros granulocitos, los basófilos derivan de progenitores y maduran en la médula ósea, circulando en su forma diferenciada y representando menos del 1% del total de leucocitos sanguíneos circulantes y normalmente no se encuentran en tejidos. Al igual que los mastocitos, su citoplasma contiene gránulos, que fijan colorantes básicos y presentan la capacidad de síntesis de mediadores similares a los presentes en mastocitos.

Su rasgo más importante es el de expresar el receptor $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ y su ulterior reclutamiento a los tejidos en los que esté presente el antígeno, puede contribuir al desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

La activación de ambos tipos celulares, mastocitos y basófilos, se realiza mediante el entrecruzamiento de moléculas $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ (Baird, 1999); proceso inducido mediante la unión de antígenos multivalentes a las moléculas de IgE fijadas a sus receptores. Efectivamente en los individuos no atópicos, la IgE asociada al mastocito o basófilo es específica para muchos antígenos diferentes y por lo tanto, es difícil que un antígeno aislado entrecruce suficientes moléculas de IgE para inducir la activación de la célula.

1.2.4.3 Eosinófilos

Este tipo celular, abundante en los infiltrados inflamatorios de fase tardía; tiene su origen en la médula ósea y tras su maduración a partir de sus precursores mieloides, circulan en sangre diferenciándose por la acción del GM-CSF y las IL-3 e IL-5 (Ying, 1997). Su presencia es normal en los tejidos periféricos y en especial en los revestimientos mucosos de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Su activación y reclutamiento hacia las zonas de inflamación en las reacciones de fase tardía, es mediada por las citoquinas producidas por las subpoblaciones Th_2 (Constant y cols., 2000); lo cual contrasta con las reacciones de hipersensibilidad retardada o celular, que está mediada por la subpoblación Th_1 y en las que intervienen la activación de los macrófagos. Es precisamente, la presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios y los subtipos celulares Th_1 y Th_2 ; los principales factores discriminatorios de ambas reacciones

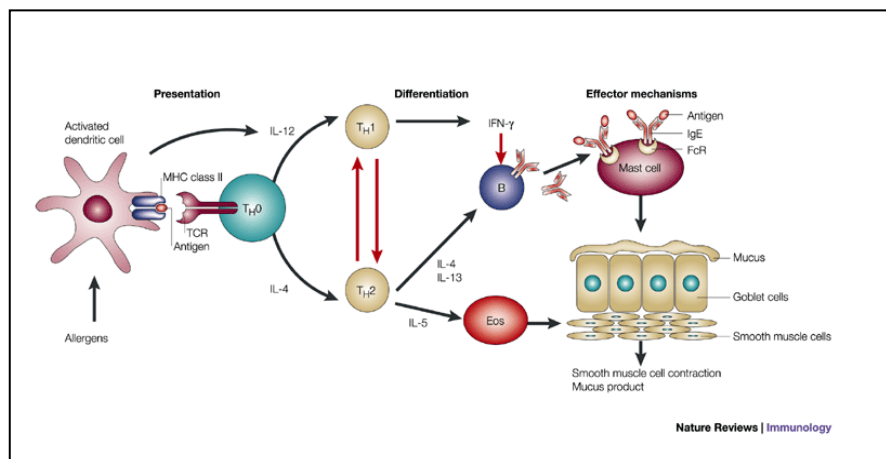


Figura 7: Fase tardía. Liberación mediadores (Marsha Wills-Karp, 2001)

La activación de los eosinófilos, depende fundamentalmente de las mismas citoquinas que intervienen en su maduración y fundamentalmente de la IL-5; que los transforma a una forma hipodensa y de un tamaño incrementado, con respecto a su forma habitual. Su reclutamiento e infiltración en las células endoteliales, viene definido por la expresión en las mismas de la selectina - E, a la cual se unen, al igual que en los neutrófilos; siendo el factor diferenciativo entre ambos tipos celulares, la expresión por parte de los eosinófilos del ligando VLA - 4 (CD49dCD29) que se adhiere a las células vasculares que expresan la molécula de adhesión VCAM - 1. La IL-4, es capaz de inducir la expresión de la molécula de adhesión VCAM - 1 en las células del endotelio, sin inducir la expresión de la selectina - E.

Otros factores de activación, que intervienen en el reclutamiento y la infiltración, son las quimoquinas, como la eotaxina, la proteína quimiotáctica de los monocitos 5, el C5a y los mediadores lipídicos PAF y LTB₄; así mismo ha sido demostrada la existencia de factores potenciadores, como es el caso de la IL-5, que incrementa la respuesta de los eosinófilos a la eotaxina.

Los eosinófilos expresan receptores para la Ig G, Ig A, IgD e Ig E. Sus gránulos contienen hidrolasas lisosómicas, como la peroxidasa que cataliza la producción de ácido hipocloroso y proteínas específicas, como la proteína catiónica (ECP) y la proteína principal básica (BPP); ambas especialmente tóxicas para los helmintos y bacterias, así como para los tejidos circundantes. En su forma activada, los eosinófilos, producen y liberan mediadores lipídicos con propiedades antiinflamatorias, muchos de los cuales poseen propiedades vasoactivas que incrementan los efectos biológicos de los mediadores producidos por los mastocitos y basófilos. En particular la producción de este tipo de mediadores es por vía de la 5 y 15-lipooxigenasas, que conducen a la producción del LTC₄ y sus derivados LTD₄ y LTE₄, potentes estimuladores de la actividad vasomotora, la broncoconstricción y la secreción de moco. PAF y citoquinas, como la IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM - CSF, MIP - 1 α , TNF - α , RANTES y eotaxina han sido descritas., aun cuando no se conoce su significación biológica (Wardlaw y cols., 1995).

1.3 Alérgenos. Origen y obtención

La mayoría de los alérgenos son proteínas o glicoproteínas con una masa molecular en el rango de los 5 a 100 kDa, y con puntos isoeléctricos ácidos que no se distinguen especialmente de otras moléculas proteicas. Sin embargo, existen una serie de características que pueden favorecer que una proteína o sustancia en general actúe como alérgeno, como son: capacidad para alcanzar el sistema inmune, complejidad molecular, concentración, solubilidad, extrañeza del organismo, estabilidad y características bioquímicas, entre otras. También pueden actuar como alérgenos, hidratos de carbono y componentes de bajo peso molecular que por su fuerte reactividad se conjugan con proteínas del huésped y actúan como haptenos. Los alérgenos también pueden aparecer como resultado de la interacción de un fármaco. (Holgate, 1993).

La sensibilización a un alérgeno no solo depende de características intrínsecas a él, sino también de su presencia conjunta con factores ambientales como

humo, polución o factores ligados a la inmunidad del individuo como predisposición genética, infecciones, inmunodepresiones debidas a patologías o tratamientos médicos, situaciones de estrés, etc. Las fuentes más complejas de alérgenos son el polen, los hongos y los ácaros, de los que entre un 20% y un 60% de sus proteínas son alergénicas. Otros alérgenos menos complejos son epitelios de animales, orinas, etc. (Holgate, 1993)

1.4 Diagnóstico en alergia

Los alérgenos se definen como antígenos capaces de inducir una respuesta inmune mediada por Ig E y el método estándar de oro, capaz de determinar una sensibilidad alérgica, es la prueba cutánea y la determinación de inmunoglobulina E alérgeno específica en suero. Los alérgenos presentes en una fuente alergénica presentan dos características funcionales en base a su capacidad fijadora de inmunoglobulina E, que les permite su clasificación de relevantes, cuando su prevalencia es superior al 5% y mayores, cuando su capacidad fijadora de inmunoglobulina E es superior al 50% o bien cuando inducen una prueba cutánea inmediata positiva en más del 90% de los pacientes sensibilizados a la fuente alergénica.

Los extractos alergénicos son obtenidos a partir de fuentes naturales o fuentes de sensibilización (van Ree, 1996) y están formados por componentes de naturaleza proteica principalmente hidrosolubles y que dependiendo de sus estructuras, podrían presentar una reactividad cruzada con otras fuentes alergénicas, tal es el caso de las profilinas (Valenta, 1991) y por tanto éste apartado debe ser cuidadosamente valorado en vía a conseguir diagnosticar la fuente de sensibilización primaria e idealmente el alérgeno causal.

En la década pasada se han desarrollado múltiples líneas de investigación, que han permitido disponer de las actuales bases de datos en las que se encuentran las principales características físico-químicas y funcionales de los alérgenos y al mismo tiempo, tras la elucidación de sus estructuras y las técnicas recombinantes, se ha conseguido describir los alérgenos con mayor relevancia clínica (Hiller, 2002), pero que en cualquier caso, los estudios deben de referir al alérgeno nativo las características que se muestren por parte de los alérgenos recombinantes.

La disponibilidad de alérgenos recombinantes ha permitido avances excepcionales en la investigación de los alérgenos presentes en las fuentes alergénicas y de éste modo se ha podido acelerar y describir en muchos casos cuales de los alérgenos presentes en un extracto alergénico son los implicados en las manifestaciones clínicas. La aplicación de los llamados “microarrays”, capaces de detectar un elevado número de posibles alérgenos causantes de alergia con cantidades muy pequeñas de material biológico es un claro ejemplo del futuro en la investigación clínica actual (figura 8).

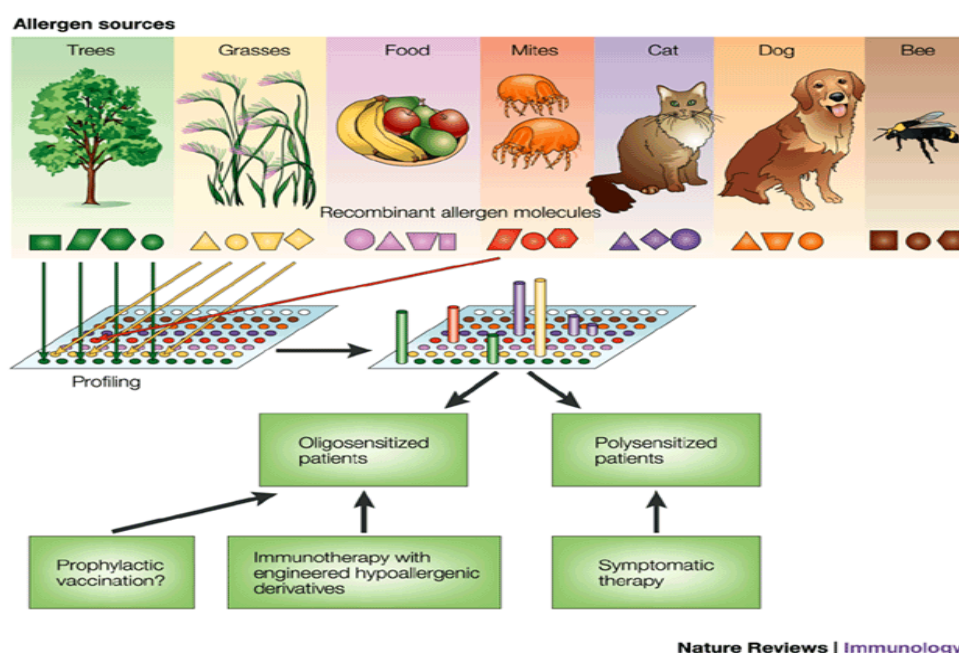


Figura 8: Paneles con alérgenos para ensayos microarrays (Hiller, 2002)

El interés de este estudio se centra en el grupo de neumoaérgenos conformado por los hongos, que junto a pólenes, ácaros y epitelios de animales suponen la causa de alergia más frecuente en nuestro medio

2. LOS HONGOS

2.1 Biología de los hongos:

Los hongos son organismos eucariotas desprovistos de clorofila, lo que determina su incapacidad de elaborar sus propios nutrientes a partir de la fotosíntesis, característica que los diferencia totalmente de los organismos del reino *Plantae*. Heterótrofos (saprofitos o parásitos), unicelulares o más típicamente filamentosos, con paredes celulares quitinosas (N-acetil glucosamina) o de celulosa (D-Glucosa polimerizada) y de otros glúcidos complejos, que realizan su nutrición por adsorción y presentan tipos de reproducción tanto sexual como asexual. Los hongos, dentro de la taxonomía, son considerados un reino aparte, evolutivamente diferentes del vegetal y del animal, siendo el carácter diferenciativo la capacidad de sintetizar quitina (Burge, 1992).

El principal papel que juegan los hongos en el ecosistema es la degradación de la materia orgánica muerta y su reincorporación al suelo. Algunos hongos, sin embargo son parásitos y patógenos.

La patogenicidad de los hongos es muy variada. Existen patógenos primarios (*Histoplasma*, *Coccidioides*) y patógenos oportunistas (*Candida*), o aquellos cuyos antígenos producen enfermedades o fenómenos alérgicos. Muchos hongos producen metabolitos que causan serios daños a la salud. Sin embargo, muchas especies son utilizadas en la industria para producir

medicamentos como antibióticos, o metabolitos de interés comercial como ácidos orgánicos o etanol, así como la elaboración de alimentos (vino, cerveza, queso, etc.) o para consumirlos directamente.

Los hongos presentan una distribución amplia y ubicua, pueden vivir prácticamente en cualquier lugar donde exista humedad y materia orgánica, incluso en forma de líquenes hasta en las rocas antárticas y en un amplísimo intervalo de temperaturas (-5 a 50°C). Uno de los principales parámetros que afectan al desarrollo de los hongos es la humedad que debe ser mayor de 70%, aunque existen especies xerofilicas, y las especies que crecen en interiores suelen ser capaces de crecer en ambientes menos húmedos. El pH, a diferencia de las bacterias, en el caso de los hongos prefieren un medio ácido para su crecimiento, siendo el óptimo alrededor del pH 6 para la mayoría de las especies.

Los hongos son conocidos y utilizados desde antiguo. Una de las más importantes civilizaciones antiguas, la civilización micénica, debe su nombre a un hongo. En 1729 Pier A. Micheli publicó su obra "*Nova Plantarum*" donde incluyó amplias investigaciones sobre hongos. Asimismo, desde antiguo se han utilizado setas como alucinógenos en ritos religiosos y levaduras en las fermentaciones, así como se han conocido efectos devastadores en la agricultura (royas, mildius, carbones y otros fitopatógenos). En 1800, A. Bassi hizo los primeros descubrimientos sobre micopatología y a finales del XIX (Torres Rodríguez JM, 1984) R. Saboraud sistematizó los estudios en micopatología en su obra "*Les Teignes*" de 1910 (Martínez, 1986)

2.2 Clasificación y características principales:

Existen 70.000 especies descritas de hongos, de origen evolutivo acuático en su inicio hace 700 millones de años y que ulteriormente hace 500 millones de años, en el principio del Paleozoico como consecuencia de la acumulación de materia orgánica fuera del agua, permitió su diversificación y la aparición de una gran multitud de especies descomponedoras de materia orgánica y parásitas de los organismos terrestres. Los hongos se pueden clasificar dentro del Reino Mycetae o Fungi, de acuerdo a varios criterios, como la forma de reproducción, constitución de la pared celular, morfología macro y microscópica de las colonias, ... etc. y que a pesar de su diversidad, solo se conocen dos unidades básicas. Las levaduras que tienen una estructura típicamente unicelular y en general, se reproducen por división central o por gemación y los hongos, de los que los más comunes, están formados por hebras ramificadas de 3 a 10 mm de anchura denominadas hifas y el agregado de las hifas se le denomina micelio. Los hongos que forman micelio suelen clasificarse en dos grupos artificiales: setas y mohos u hongos filamentosos. El término moho designa aquellos tipos que carecen de estructuras reproductivas macroscópicas, pero que pueden producir colonias visibles u otros tipos de crecimiento vegetativo (Burge, 1992).

Los hongos presentan reproducción sexual y asexual por medio de esporas de ambos tipos. También los fragmentos de hifas juegan un importante papel en la diseminación. Las esporas asexuales pueden ser esporangiosporas, si se desarrollan en estructuras cerradas (esporangios) o conidioesporas, si se

forman en estructuras abiertas (conidios), siendo en general, las esporas de los hongos comunes más alergénicos las que son producidas asexualmente.

Una misma especie de hongo es capaz de reproducirse por vía sexual y asexual. La fase por la cual un hongo forma conidios asexuales se denomina “imperfecta” o “anamórfica” y es diferente de la productora de esporas denominada “perfecta” o “teleomórfica”. A menudo ambas fases no se dan a la vez y dependiendo de las condiciones de crecimiento, una u otra pueden resultar suprimidas, planteando dificultades de nomenclatura, dado que simultáneamente se ocupan dos categorías taxonómicas.

La clasificación de los hongos se basa en su forma de reproducción y tipo de espora sexual en distintos órdenes taxonómicos:

División *Zygomycotina*: se reproduce de forma sexual mediante zigosporas y asexualmente mediante esporangiosporas. Ejemplo *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*

División *Ascomycota*: las ascosporas sexuales se encuentran dentro de un receptáculo denominado “asco” y la reproducción asexual es mediante conidios. Ejemplo: *Pseudallescheria boydii*, *Gyromitra esculenta*.

División *Basidiomycota*: su reproducción sexual es mediante basidiosporas y asexualmente algunas especies producen conidios. Ejemplo: *Cryptococcus neoformans*, *Lactarius sp.*, *Amanita sp.*

División *Deuteromycota (Fungi Imperfecti)*: no se conoce su reproducción sexual, por lo que únicamente se consideran amorfos.

Como grupo, los Deuteromicetos son de un interés considerable en referencia a su relación como fuentes alergénicas sensibilizantes en los procesos de alergia. El grupo incluye géneros de suma importancia alergénica como *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Stemphylium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Epicoccum*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Los hongos patógenos *Candida albicans* y *Coccidioides immitis* son también hongos Deuteromicetos. La taxonomía de los Deuteromicetos esta basada principalmente en las características de sus conidios (perfil, color y reptación). (Hawksworth DL, 1995); (Ainsworth GC, 1973).

Con la aplicación de la taxonomía molecular se ha conseguido establecer que existen diversos grupos de hongos. Por ejemplo, la comparación de moléculas como el ARN ribosomal 12S, ha permitido trazar árboles filogenéticos bastante precisos y demostrar que los hongos no constituyen un grupo monofilético (descendencia a partir de un antepasado común), sino que son polifiléticos (descienden de antepasados diferentes) y las semejanzas se deben a un fenómeno de convergencia evolutiva.

3. LOS HONGOS COMO ALERGENOS

3.1 Aerobiología de los hongos:

Los hongos como causantes de reacciones alérgicas se conocen desde la antigüedad. En 1726 Sir John Floyer describe síntomas de asma en pacientes que acababan de visitar una bodega. En 1873, Blackley sugirió que *Chaetomium* y *Penicillium* eran especies asociadas con los ataques de asma. En 1924, van Leguen observó la relación del clima con el asma y encontró una correlación entre la aparición de esporas de mohos en la atmósfera y los ataques de asma de la población. En la década de los años 30, Prince y cols (Prince 1934) y Feinberg (Feinberg, 1935) observaron que el aire de exteriores era una fuente importante de alergia a hongos y demostraron que muchos de sus pacientes presentaban pruebas cutáneas positivas frente a extractos de hongos. A lo largo de la historia se han encontrado más de 80 géneros de hongos asociados a procesos alérgicos (Koivikko, 1983). En Estados Unidos son causa de sensibilización en más del 80% de la población asmática (López, 1985) y la especie *Alternaria alternata* es una de las formadoras de esporas atmosféricas más comunes en la zona del medio-oeste (O'Hollaren MT, 1991) y en España es causa de aproximadamente el 20% de los pacientes con alergia (D'Amato, 1997)

En el medio ambiente, el ser humano está expuesto a más de 80 géneros de hongos asociados a procesos alérgicos (Koivikko A, 1983), bien suspendidos en el aire o asociados a otros sustratos. Los conteos de esporas en el aire suelen exceder en 1.000 veces a los de granos de polen. Se pueden alcanzar niveles de más de 125.000 esporas por metro cúbico de aire (Gregory, 1973). Además el conteo de esporas sigue un ciclo estacional alcanzando las máximas concentraciones en verano y otoño. Estudios realizados en Estados Unidos muestran como muchas ascosporas y esporas de hongos imperfectos aparecen durante los periodos cálidos del inicio de la primavera. Después de este pico inicial persiste su aparición durante los meses de verano, dándose un segundo pico en los meses de otoño. Estos datos han sido confirmados en Europa. Las variaciones estacionales de la flora fúngica en interiores refleja la composición en exteriores pero con menores variaciones (Nilsson, 1978).

Las esporas de los hongos miden entre 2 y 3 μm (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*) y hasta las 160 μm (*Helminthosporium*), con un tamaño promedio entre 2 y 10 μm , aunque se han encontrado esporas de *Alternaria longissima* de 500 μm de longitud (Simon-Nobbe B, 2008) y por otra parte, existen otras partículas fúngicas como restos de hifas y partículas procedentes del metabolismo de estos organismos que pueden pasar a estar en suspensión aérea y por lo tanto entrar en contacto con pacientes sensibilizados o susceptibles de serlo. El tamaño de los conidios (2-100 μm) hace posible su inhalación y su profunda penetración por las vías respiratorias

Las esporas fúngicas se pueden encontrar tanto en interiores como en exteriores. En los Estados Unidos, varios estudios han demostrado que *Alternaria* y *Cladosporium* son los géneros atmosféricos más comunes (Nilsson, 1983; Cole, 1984) y coinciden con los encontrados en España (Calvo, M A, 1980), asociándose al asma una posible sensibilización con *Alternaria*. (Robert K. Bush, 2004). El patrón de esporas atmosféricas refleja la composición en el

exterior, además existe una flora fúngica independiente dominada por Deuteromicetos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* y levaduras. El patrón de esporas en interiores es una mezcla de las atmosféricas exteriores y de las propias del interior (Burge, H A, 1982) y sus niveles se ven favorecidos por la condensación de la humedad sobre las paredes y techos, la presencia de madera en putrefacción, alimentos mohosos, plantas de interior y la acumulación de polvo sobre superficies (Codina, R, 2008), siendo las esporas aerovagantes más frecuentes las pertenecientes a especies de Deuteromicetos de los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, así como de diferentes levaduras.

Sin embargo, en países tropicales pueden no existir algunas especies, por ejemplo, en Nigeria *Cladosporium* es prácticamente inexistente (Olonitola, 1994). En muestreos domésticos en Inglaterra y Escocia, especialmente en aquellos hogares con aire acondicionado, las densidades de los conidios excede incluso la del exterior (450.000 propágulos por metro cúbico) (Nilsson, 1983). En estudios pormenorizados de presencia de especies en el aire a nivel de España (Torres Rodriguez JM., 1982) y fuera de España, se confirma la tendencia antes descrita (Gravesen, 1983; Beaumont, 1985)

Sin embargo no parece existir una correlación exacta entre la frecuencia de aeroalérgenos fúngicos de diferentes especies y reactividad de las mismas. Así Einarsson (Einarsson, 1992) indica que *Alternaria* es el género mayormente involucrado en procesos de alergia inmediata, mientras que *Penicillium* se considera un alérgeno fúngico de importancia menor aunque en ocasiones ostente una mayor presencia tanto como alérgeno de interiores como de exteriores (Tarlo, 1988) López y Salvaggio (López, 1985), indican como principales hongos alergénicos *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Rhizopus* y *Mucor* seguidos de algunos Ascomicetos y algunos Basidiomicetos por este orden. Asimismo, Karlsson-Borga y cols (Karlsson-Borga, 1989) en dos grupos de pacientes procedentes de Escandinavia y Estados Unidos demostraron diferentes sensibilizaciones.

En cuanto a los Basidiomicetos existe evidencia de su papel como productores de alergia (Horner, 1995). Como especies importantes citaremos por este orden, *Schleroderma*, *Coprinus*, *Psilocybe*, *Inonotus*, *Ganoderma*, *Boletinelus*, *Agrocybe*, *Boetius*, *Armillaria*, *Pleurotus*, *Amanita*, *Chlorophillum* y *Cantharellus*.

Varias técnicas han sido desarrolladas para tratar de abordar la cuantificación de esporas en la atmósfera. Inmunoensayos alérgeno específicos, que utilizan anticuerpos monoclonales frente a los mencionados alérgenos, no siempre revelan la cantidad de alérgeno resuspendido en la atmosfera, ya que la actividad alérgénica puede estar distribuida a través de otros componentes fúngicos incluyendo los fragmentos miceliares. Incluso tales componentes podrían estar asociados a partículas en suspensión. Estos ensayos todavía no han conseguido la fiabilidad que ya tienen ensayos similares para otros alérgenos (Barnes C, 2000)

3.2 Diagnóstico e inmunoterapia en la alergia a hongos:

Aas et al (Aas, 1980), utilizando la técnica del prick en pruebas cutáneas (SPT) y la determinación de IgE específica mediante técnica RAST en 80 niños asmáticos con historia clínica de alergia a hongos, observaron que, dependiendo del extracto alergénico usado, la frecuencia de reacciones positivas fueron: *Alternaria* 10-35%, *Aspergillus* 10-43%, *Cladosporium* 13-65%, *Mucor* 1-28% y *Penicillium* 3-33%. La correspondencia con el RAST positivo fue de 59, 63, 86, 40, y 56%, respectivamente.

La primera vez que se estableció una clara relación causa-efecto entre los hongos y la alergia fue en los años 80 del pasado siglo en los trabajos de Malling y cols. (Malling, 1985; Malling, 1986; Malling, 1987; Malling, 1988) quien observó que la severidad de la enfermedad alérgica estaba en relación con la aparición de esporas (Malling, 1992).

Existen múltiples dificultades en el diagnóstico y, aun mas, en el tratamiento específico mediante inmunoterapia. Así, frecuentemente se puede observar ausencia de reactividades cutáneas a extractos fúngicos habituales, en pacientes con una clínica evidente de alergia a hongos o pacientes claramente reactivos a extractos fúngicos, que no responden satisfactoriamente a la inmunoterapia, por lo que no ha sido posible establecer la exacta prevalencia de este tipo de alergia. Existe una gran variedad de resultados dependiendo de la población estudiada, de los extractos utilizados y de las especies seleccionadas (Horner, 1995). Así, se puede observar, como la frecuencia de reactividades depende tanto de la fuente del alérgeno, como de los criterios de selección de pacientes. Por ejemplo, las reacciones a extractos comerciales de *Cladosporium herbarum* varían de 0 a 12% en la misma población (Aas, 1980).

Mishra et al (Mishra, 1992) indican dos factores fundamentales que podrían explicar estos hechos. En primer lugar, los patrones de exposición a las especies de hongos son, hasta la fecha virtualmente desconocidos y, en segundo lugar, los alérgenos fúngicos utilizados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas han sido producidos en base a conocimientos parciales, tanto en relación a la exposición de especies alergénicas como de la naturaleza de los alérgenos implicados.

De hecho, la verdadera incidencia de la alergia a hongos no se conoció hasta que no se dispuso de extractos estandarizados para estudiar poblaciones bien definidas. Estos extractos siguen métodos de estandarización que están basados en su comparación con un extracto patrón o de referencia (IHR), por medio de la aplicación de una serie de pruebas cutáneas de prick o intradérmicas sobre voluntarios alérgicos a la fuente alergénica. La producción de los extractos posteriores se realiza tomando como referencia el IHR y usando métodos inmunoquímicos que, como principal herramienta, emplean la IgE del suero de los pacientes seleccionados (van Ree y Aalberse, 1999).

La exposición en interiores, exteriores y en lugares de trabajo puede inducir sensibilidad a hongos. Por lo tanto, la variedad de hongos posibles productores de alergia es mucho mayor que la que pueda incluirse de manera práctica en un panel de pruebas cutáneas, lo que resalta la importancia del muestreo ambiental. Sobre la base de estudios aerobiológicos llevados a cabo

en diferentes partes del mundo, pruebas cutáneas y estudios de alérgenos, existe un consenso sobre las especies que se deben utilizar. Estas son como mínimo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium solana* y *Penicillium chrysogenicum*.

Las pruebas de provocación a hongos pueden ser un buen método de diagnóstico, pero también pueden generar falsos positivos (Spector, 1979). Estas pruebas pueden ser nasales, bronquiales y conjuntivales con extractos alérgenos. También se han empleado pruebas de inhalación desarrollada por Harris (Harris, 1940) con *Alternaria*., al esparcir por la habitación un cierto número de esporas y mantenerlas circulando por medio de ventiladores. Nilsson y Aas (Nilsson, 1978). En general se admite que la prueba de provocación bronquial es frecuentemente necesaria para alcanzar un diagnóstico decisivo en pacientes en los cuales otras pruebas son equivocadas.

A pesar del desarrollo de las técnicas de diagnóstico “*in vitro*” e “*in vivo*”, el diagnóstico de alergia a hongos aun hoy en día es difícil, ya que la mayoría de los pacientes están constantemente expuestos a una amplia variedad de propágulos y muchos sujetos reaccionan frente a alérgenos inhalantes de origen no fúngico. Adicionalmente pueden aparecer síntomas debidos a hongos cuya aparición no es estacional. Estos factores eclipsan cualquier correlación entre la aparición de esporas de hongos y los síntomas.

La mayor evidencia de la eficacia de la inmunoterapia en la alergia a mohos la presentaron Malling y cols. en Escandinavia (Malling, 1985; Mallin, 1986; Mallin, 1987; Mallin, 1988), estudiando 22 pacientes asmáticos con evidencia clínica de alergia a *Cladosporium*, pruebas cutáneas en prick positivos y positivos asimismo a pruebas de provocación bronquial. Estos autores realizaron un control a doble ciego y placebo. La inmunoterapia fue iniciada con dosis de 10 UB hasta 100.000 UB. Se observó mejora clínica en el 81% del grupo tratado frente al 27% del grupo placebo.

También se han realizado estudios que confirman la utilidad de la inmunoterapia en el tratamiento de la alergia a *Alternaria* (Cantani, 1988; Horst, 1990). De todas formas, la inmunoterapia, especialmente con extractos fúngicos, ha sido asociada con una alta frecuencia de efectos colaterales. Otros estudios (Kaad, 1982; Ostergaard, 1986) también registraron reacciones de este tipo. Muchas de estas reacciones pueden ser debidas, no a los alérgenos, sino a sustancias irritantes presentes en el extracto.

4. Alérgenos de hongos

A pesar de la gran cantidad de hongos potencialmente involucrados en el desarrollo de procesos alérgicos, existen relativamente pocos alérgenos caracterizados y purificados. Los más estudiados pertenecen a los Ascomyta, géneros de Dothideales como *Alternaria* y *Cladosporium*, Eurotiales como *Aspergillus* y *Penicillium*, Hypocreales como *Fusarium*, Onygenales como *Trichophyton*, Saccharomycetales como *Candida*, Tuberculariales como *Epicoccum* (Horner, 1995).

En la actualidad se han identificado aproximadamente 150 alérgenos fúngicos de unos 80 géneros, de los cuales 70 se han caracterizado correctamente (Simon-Nobbe, B. 2008).

4.1 Género *Alternaria*

Alternaria alternata (*A. tenuis*) es uno de los hongos más importantes desde el punto de vista de la alergia. Es extremadamente común y cosmopolita. Crece como saprofito en plantas, alimentos, suelos y textiles. Su intervalo de temperaturas de crecimiento es de 2-32°C, siendo su óptimo de 25°C (Gravesen, 1994).



Figura 9: cultivos y morfología de *Alternaria alternata*

Produce colonias de crecimiento rápido, vellosas, con tonos verde oliva, gris, marrón o negro en su superficie y reverso de color marrón oscuro o negro. Sus conidios son de color pardo, con forma ovoide o elipsoidal (forma de maza) de 18-80 x 7-18 μm de tamaño. Presentan septos transversales y verticales de disposición irregular y por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios.

Las dictiosporas de *Alternaria* son abundantes y conocidas productoras de asma (Licorish, 1985). Alcanzan su mayor abundancia en zonas de cultivo de cereales llegándose a detectar de 500 a 1.000 esporas por metro cúbico de aire en días secos de finales de verano y otoño (Nilsson, 1983). Si bien se conocen muchas especies de *Alternaria*, *Alternaria alternata* (*tenuis*) es la más estudiada desde el punto de vista de la alergia. Este hongo puede provocar fenómenos de hipersensibilidad tipo I y III e infecciones muy extrañas, pudiendo actuar también como fitopatógeno (Gravesen, 1994).

Entre los metabolitos producidos por esta especie se encuentran algunos caracterizados como micotoxinas, destacando el monometileter de alternariol, las toxinas mutágenas alertoxinas I y II, altenueno, altenusina y ácido tenuazónico (Ponton, 2002).

La selección de la cepa, la composición del medio de cultivo y las condiciones del mismo, presentan una importancia crucial en la expresión de los alérgenos que presenta *Alternaria alternata*, dada su variabilidad antigénica y pleomorfismo (Palacios et al. 1986).

El alérgeno mayor de *Alternaria alternata* (Alt a1) reacciona con la Ig E sérica en el 82% de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata* (De Vouge, 1996) y fue aislado por primera vez por Yunginger y cols (Yunginger y cols, 1980). Se trata de una glicoproteína dimérica heterogénea de 28-30 kDa, que

puede separarse en condiciones reductoras en dos subunidades de 14.5 y 16 kDa y con al menos 5 isoformas, de pI 4-4,5. Alt a 1 es una glicoproteína de secreción presente en micelio y filtrado de medio de cultivo. Alérgenos con propiedades similares han sido descritos en *Alternaria alternata* (Curran, 1993; Nyholm, 1983; Steringer, 1987).

De los 13 alérgenos que componen su mosaico alérgénico en 10 de ellos se ha podido precisar la naturaleza y la función biológica, siendo en la mayoría de ellos proteínas de mantenimiento celular. Otros alérgenos representativos, pero en ningún caso categorizados como mayores de *Alternaria alternata* son Alt a 2, una ALDH de 25 kDa; Alt a 3, una HSP 70; Alt a 4, una disulfuro isomerasa, Alt a 5, una proteína ribosomal P2 de 11 kDa; Alt a 6, una enolasa de 45 kDa; Alt a 7, una YCP4 proteína de 22 kDa; Alt a 8, una manitol deshidrogenasa; Alt a 13, una glutatión S transferasa de 26 kDa.

4.2 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* constituye uno de los grupos de hongos más ubicuos encontrados en el entorno humano. Engloba a 132 especies diferentes y conforma conjuntamente con el género *Penicillium* los patógenos predominantes en ambientes interiores (Horner, 1995).

La especie *Aspergillus fumigatus* produce colonias de crecimiento rápido y superficie aterciopelada, blanca inicialmente y que cambia a verde con el desarrollo de las cabezas conidiales. El reverso es incoloro o bien presenta tonalidades que oscilan del amarillo o crema al marrón claro. Las hifas tienen un diámetro de 7 – 10 µm y están septadas y ramificadas. Las cabezas conidiales son típicamente columnares (hasta 400 µm) compactas, con tonos verdosos. Conidióforos cortos (hasta 300 µm de longitud y de 5 – 8 µm de diámetro) de pared lisa, sin tabicar y sin ramificaciones. Las amplias vesículas (20-30 µm de diámetro) se encuentran coronadas de esterigmas de una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular, con ejes paralelos al del conidióforo. Los conidios pequeños y globosos de 2.5 a 3 µm de diámetro y de color verde oscuro son siempre unicelulares y uni o multinucleados.

Este hongo crece como saprófito y tiene una distribución universal. Es termotolerante, creciendo en intervalos entre 12 y 52°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 37 y 43°C y su cultivo en agar malta produce una fuerte esporulación. Su capacidad de deteriorar gran cantidad de frutos almacenados ha permitido también rentabilizar procesos industriales biotecnológicos en relación con la producción de proteínas y antibióticos.

Aspergillus fumatus es otro de los principales hongos involucrados en los procesos alérgicos. Se trata del agente etiológico involucrado en el conocido síndrome de Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA). Otras especies como *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. terreus* también han sido descritas como involucradas en reacciones alérgicas (Greenberger PA, 1988).

El alérgeno Asp f 1, una ribotoxina de la familia de las mitogilinas de un peso molecular de 18 kDa muestra una reactividad cutánea en el 80% de los pacientes afectados de ABPA y en el 50% de los pacientes asmáticos, así como

entre el 68-83% de los pacientes con pruebas cutáneas positivas, presenta también anticuerpos IgE específicos en su suero (Arruda LK, 1992).

Otros alérgenos representativos de *Aspergillus fumigatus* son Asp f 2, de 37 kDa, con una fuerte asociación en la fijación de IgE en pacientes con ABPA. Asp f 3 es otro de los alérgenos que puede ser considerado como mayoritario de ésta especie al reaccionar con el 94% de los sueros de pacientes sensibilizados a ésta especie, se trata de una proteína de membrana peroxisomal de 19 kDa, que presenta una elevada homología con las proteínas de membrana peroxisomales A y B descritas para *Candida boidinii* (Hemmann, 1997, 1998). Asp f 6 una proteína superóxido dismutasa dependiente del manganeso y con un peso molecular de 26.5 kDa, alta mente conservada a nivel filogenético y perteneciente a la superfamilia de las metaloenzimas es un alérgeno discriminativo para el diagnóstico serológico de la ABPA, cuando aparece conjuntamente con los alérgenos Asp f 2y Asp f 4 (Cramer 1996, 1998). Asp f 8, una proteína ribosomal ácida P2 de 11 kDa, muestra también un elevado grado de conservación entre los organismos eucariotas y se caracteriza por la presencia de reactividad cruzada con alérgenos homólogos de *Cladosporium herbarum* y *Alternaria alternata* (Achatz 1995, Mayer 1999). Asp f 12, una HSP P90 de 90 kDa homóloga en *Candida albicans*, *Saccharomyces* y *Trypanosoma*. Asp f 13 y Asp f 18, serín-proteasas alcalinas y vacuolares comparten epítomos con otras serin-proteasas descritas en especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Shen 1999, 2007). Finalmente Asp f 22, una enolasa de 47 kDa ha mostrado su reactividad cruzada con otras enolasas de *Penicillium* (*P. citrinum*, alérgeno Pen c 22), *Alternaria alternata* (Alt a 6) y *Cladosporium herbarum* (Cla h 6) (Simon-Nobbe 2000, Lai 2006). En la actualidad existen hasta 22 alérgenos descritos en ésta especie.



Figura 10: cultivos y morfología de *Aspergillus fumigatus*

4.3 Género *Cladosporium*

Se trata de un género cosmopolita. Sus esporas y los agregados de las mismas superan en número al resto de las partículas biológicas presentes en el aire (>50.000 esporas por metro cúbico de aire) (Nilsson, 1983). Se encuentra como saprófito en restos vegetales y como parásito en espinacas, plátanos y tomates. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 18 y los 20°C. Su elevada capacidad de esporulación implica que sea uno de los hongos más relevante como alérgeno en relación con las patologías en que se implica, a salvo de raras infecciones que se han descrito (Gravesen, 1994).

Las especies más relevantes de éste género son *Cladosporium herbarum* y *Cladosporium cladosporioides*. *C. herbarum* forma colonias de crecimiento lento y de color verde oliva o negro en su superficie y en el reverso de color negro. Las hifas son septadas y los conidios pequeños (5-23 x 3-8 µm), bicelulares de color oscuro y en forma de cadenas.

Cladosporium herbarum es conjuntamente con *Alternaria alternata* uno de los hongos más ampliamente distribuidos en nuestro ambiente, tanto exterior, como interior y por consiguiente una de las mayores fuentes de sensibilización (Solomon WR, 1989). Es habitual como contaminante de cereales y propio de climas húmedos y templados, pero también en climas fríos.

Se han identificado en *C. herbarum* más de 60 antígenos, de los cuales al menos 36 presentan capacidad fijadora de IgE en suero, e identificado 14 alérgenos. Con excepción de Cla h 8 una manitol deshidrogenasa NADP dependiente de 28.3 kDa que es reconocida por el 57% de los sueros de los pacientes sensibilizados a ésta especie (Breitenbach 2002, 2005) Ninguno de los restantes ha sido categorizado como alérgeno mayoritario, con una capacidad de fijación menor del 20%. Alérgeno como Cla h 1, una pequeña proteína ácida de 14 kDa es considerado uno de sus alérgenos más relevantes. Entre el espectro alergénico encontramos de relevancia Cla h 6, una enolasa de 48 kDa, que fija IgE específica en el 20% de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*, así como también Cla h 10, una ALDH de 53 kDa y Cla h 7 una YCP5.



Figura 11: cultivos y morfología de *Cladosporium herbarum*

4.4 Género *Penicillium*

Se trata de uno de los géneros más comunes y de también amplia distribución. Se han descrito más de 250 especies del género *Penicillium*. Este género tiene una gran importancia económica, bien por el daño que ocasiona en la fruta y otros sustratos como papel, textil, etc; como por su utilización a nivel industrial. De hecho *Penicillium chrysogenum* fue el primer hongo que se empleó en la fabricación de la penicilina y mutantes derivados de éste, son aún empleados en la producción de las penicilinas F y G (Gravesen, 1994).

Se encuentran como saprófitos en suelo sobre materia vegetal y en fruta o papel en descomposición. Forma colonias de crecimiento rápido, aterciopeladas y de color verdoso con un halo micelar blanco característico. En el caso de la especie *Penicillium chrysogenum* (*P. notatum*), es característico la presencia de un exudado amarillento en el reverso. Su temperatura óptima de

crecimiento es de 25°C, pudiendo crecer entre los 5 y los 37°C. Las hifas son septadas y los conidióforos tabicados de pared lisa (200-300 µm), ramificados al final con métulas de entre 8 y 12 µm y fiálides en forma de botella de 7 a 12 µm de donde nacen cadenas de conidios unicelulares, lisos y elipsoidales de 2.5 a 4 µm de color azul o verde-azulado, sin ramificar, formando un penacho o pincel característico.

Las especies del género *Penicillium* más implicadas en procesos alérgicos son *P. chrysogenum* (*P. notatum*), *P. citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. oxalicum* y *P. spinulosum* (Muilenberg M, 1990). *P. chrysogenum* ha sido implicado en el desarrollo de asma tras la inhalación de sus esporas (Licorish, 1985), así como es la especie que más frecuentemente provoca respuestas positivas en pruebas cutáneas (Koivikko 1983, Gell 1992). Existen 11 alérgenos de *P. chrysogenum* que muestran capacidad fijadora de IgE (Shen, 1996), de los que los denominados Grupo 13 y Grupo 18, que corresponden a alcalin serin proteasas y vacuolar serin proteasas de 34 y 32 kDa respectivamente son considerados como panalérgenos fúngicos, ya que muestran un elevado grado de reactividad cruzada con otras especies de hongos (Shen, 1997).



Figura 12: Cultivos y morfología de *Penicillium chrysogenum*

4.5 Género *Stemphylium*

El género *Stemphylium* se considera comúnmente como saprófito y parásito de frutales y otras plantas. Produce colonias de crecimiento rápido, algodonosas, de coloración verdosa, ligeramente marrón e incluso negras en su superficie y siempre negras en el reverso. Las hifas son septadas y los conidióforos simples u ocasionalmente ramificados y acabados en un único conidio de 27 a 42 µm de color pardo oscuro y forma redondeada, con septos transversales y longitudinales que presentan una constricción típica y pared lisa o rugosa.



Figura 13: Cultivos y morfología de *Stemphylium botryosum*

Se ha observado que éste género juega un importante papel en la etiología de la alergia respiratoria en niños (Lelong 1986, Agarwal 1982). Mediante RAST inhibición se ha observado que *Stemphylium* contenía como alérgeno la fracción Alt a 1 descrita en *Alternaria alternata* (Yunginger, 1980). El gen que codifica para éste alérgeno Alt a 1, ha sido identificado en varias especies del género *Stemphylium* (Hong, 2005).

4.6 Género *Fusarium*

El género *Fusarium* es común en restos vegetales y como parásito de plantas como el tomate y cereales, así como de árboles. Se trata de un microorganismo saprófito y de interés patógeno en humanos induciendo micosis cutáneas, en general leves, si bien en inmunodeprimidos tiene una importancia por su capacidad de diseminación.



Figura 14: Cultivos y morfología de *Fusarium*

4.7 Género *Botrytis*

El género *Botrytis* abarca 22 especies de las que la de mayor importancia es la denominada *B. cinerea*. Se trata de un hongo patógeno de muchas especies vegetales aunque los cultivos de vid (podredumbre o moho gris) son los de mayor importancia, si bien la parasitación da lugar a los característicos vinos dulce de postre a base de pasas.

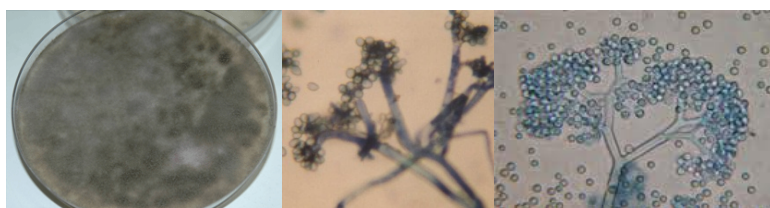


Figura 15: Cultivos y morfología de *Botrytis sp*

4.8 Género *Ulocladium*

El género *Ulocladium* abarca más de 20 especies y sus conidios, más cortos y esféricos, muestran una cierta similitud con los del género *Alternaria*. Se trata principalmente de especies parásitas de plantas y es común encontrarlas asociadas con especies de los géneros *Alternaria* y *Stemphylium*.

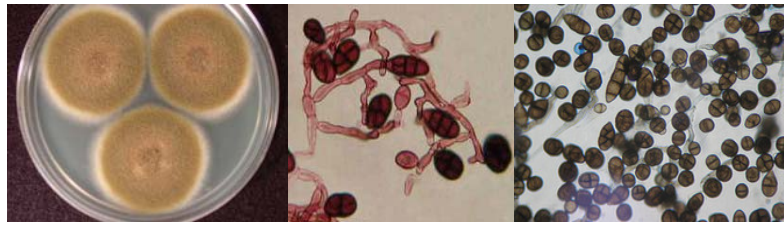


Figura 16: Cultivos y morfología de *Ulocladium botrytis*

4.9 Género *Rhizopus*

Este género abarca más de 50 especies. Se trata de un hongo filamentoso que libera grandes cantidades de esporas y que habitualmente se encuentra como contaminante de alimentos como el pan (moho del pan) y la soja. Considerado como hongo oportunista en el ser humano y muy comúnmente implicado como agente etiológico en los procesos alérgicos.



Figura 17: Cultivos y morfología de *Rhizopus*

4.10 Género *Mucor*

Este género es un saprófito muy común en suelos y contaminante habitual con *Rhizopus* de la contaminación de alimentos como el pan y las patatas en putrefacción.



Figura 18: Cultivos y morfología de *Mucor mucedo*

4.11 Género *Trichophyton*

Se trata de especies micelar hialino mayoritariamente antropofílicas causantes de las denominadas tiñas (*D. mentagrophytes*, *D. rubrum*, *D. interdigitalis*, *D. violaceum*, *D. tonsurans*) y conocidos como Dermatofitos. Son hongos adaptados a la queratina humana y en los que las variedades zoófilas son la principal fuente de contagio. Habitualmente descritas como fuentes de sensibilización.

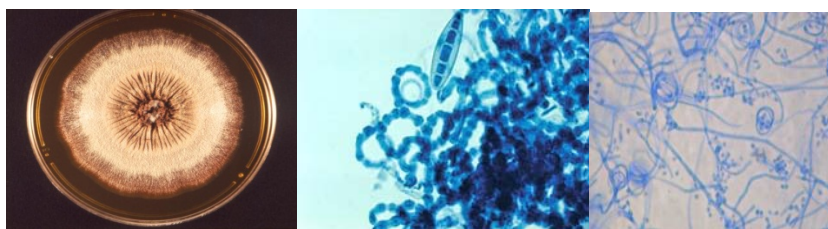


Figura 19: Cultivos y morfología de *Trichophyton sp*

4.12 Género *Candida*

Levaduras pertenecientes a la clase *Deutermycotina*, con más de 150 especies descritas y que suelen formar parte de la flora microbiota normal humana y animal y de las que la especie *C. albicans* es la mas representativa y mejor estudiada. Se trata de un hongo oportunista que puede llegar a causar micosis (candidosis o candidiasis) desde leves y superficiales, incluyendo las de las membranas mucosas y muy comunes, a graves al diseminarse en un determinado número de pacientes. Habitualmente se ha considerado a la especie *C. albicans*, como una fuente de sensibilización en las enfermedades alérgicas.

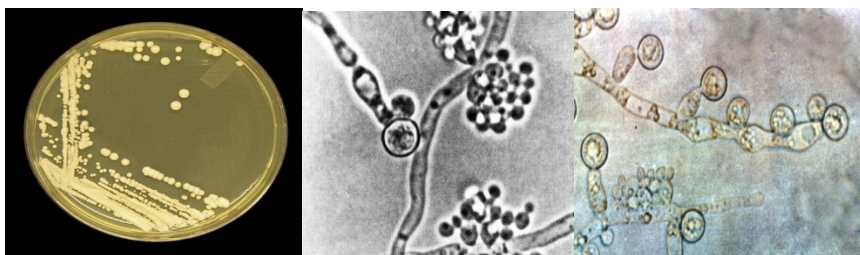


Figura 20: Cultivos y morfología de *Candida sp*

5. REACTIVIDAD CRUZADA

Es un hecho conocido el que los pacientes alérgicos a hongos lo son, generalmente, a varias especies a la vez. El termino reactividad cruzada indica la presencia de epítomos similares en diferentes especies. Esto puede ser una de las causas de la reactividad múltiple que presentan estos pacientes. Sin embargo, la reactividad cruzada debe ser diferenciada de la polisensibilización paralela, es decir, de aquellos casos en los que el paciente presenta reactividad debido a su exposición a cada una de las especies a las que es alérgico independientemente. Este hecho no es extraño ya que, por una parte, un paciente que se haya expuesto a un ambiente favorable para el crecimiento y dispersión de un hongo, se verá expuesto a otras muchas especies de hongos que comparten ese nicho ecológico debido a la gran ubicuidad y abundancia de estos seres vivos. Por otra parte además de la multiexposición, hay que tener en cuenta el hecho de que un paciente atópico se trata de un individuo especialmente susceptible a la sensibilización por antígenos, por lo que es de esperar que no solo presente sensibilización a varias especies de hongos sino incluso también a otros alérgenos no fúngicos a los que se haya expuesto.

No obstante, tanto la reactividad cruzada como la polisensibilización son prácticamente indiferenciables desde un punto de vista exclusivamente clínico. En ambos casos todas las pruebas “*in vivo*” dan resultados igualmente positivos, por lo que aun existe la controversia de conocer si este hecho se debe principalmente a uno de los fenómenos anteriormente descritos.

La reactividad cruzada es posible estudiarla o detectarla “*in vitro*” por estudios inmunoquímicos que impliquen una inhibición competitiva de la unión de los anticuerpos por el antígeno (inhibición del RAST, inhibición del ELISA, Inhibición del blotting (Einarsson, 1992).

El grado de reactividad cruzada dependerá del número e importancia relativa de los epítomos comunes de los alérgenos. Teóricamente, es esperable que existan mas epítomos comunes cuanto mayor sea la proximidad filogenética de las especies a estudiar, es decir, se espera que la reactividad cruzada sea mayor entre diferentes cepas, que entre diferentes especies, y a su vez, mayor que entre diferentes géneros (Aukrust, 1984). Sin embargo, no se puede descartar la reactividad cruzada entre hongos y alérgenos no fúngicos debido a componentes presentes en una gran cantidad de seres vivos.

La presencia de epítomos comunes entre alérgenos es favorable para el diagnostico, ya que reduce el numero de antígenos necesarios en el panel de extractos. Por lo tanto, un número razonablemente pequeño de alérgenos que compartan epítomos comunes, serian capaces de detectar la reactividad a un elevado panel de hongos.

Se han llevado a cabo varios estudios de reactividad cruzada entre diferentes grupos, tanto relativos a antígenos como a alérgenos. Biguet y cols (Biguet, 1964) realizaron uno de los primeros estudios de similitud antigénica sobre especies del género *Aspergillus*. Kim y Chaparas (1979), trabajando con especies de este mismo género (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fumigatus* var. *ellipsoideus*, *Aspergillus phialiseptus* y *Aspergillus flavus*) encontraron que el 89% de los antígenos de *Aspergillus fumigatus* eran comunes a todas las cepas y variedades de esta especie, mientras que la similitud entre especies es mucho menor (19-35%). La reactividad cruzada parecía deberse a que se encontraba asociada principalmente a las fracciones glicoproteicas y carbohidratos.

En algunos casos no se ha encontrado reactividad cruzada entre diferentes especies, tal es el caso entre *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, y *Penicilium* (Martínez, 1994a), utilizando técnicas de inhibición del RAST e inhibición del ELISA con sueros experimentales.

Por el contrario, existen otros estudios que indican la presencia de reactividad cruzada entre especies diferentes. Por ejemplo, se han encontrado muchas similitudes entre géneros relacionados morfológicamente como *Alternaria* y *Ulocladium*, demostrándose la presencia del alérgeno Alt a 1 en ambos géneros (Gravesen, 1983). Por inhibición del RAST, Agarwal y cols (1982) observaron que *Alternaria* y *Stemphylium* contenían varios antígenos comunes, entre ellos el alérgeno Alt a 1. Otros estudios no han encontrado reactividad cruzada medida por RAST inhibición o inmunoblotting inhibición, entre *Aspergillus* y

Cladosporium, ni tampoco entre *Aspergillus* y *Alternaria* y si se ha encontrado entre *Alternaria* y *Cladosporium* (Tee, 1987). Posteriormente se ha estudiado la relación entre *Fusarium solani* y otros hongos y se han encontrado varios determinantes antigénicos comunes entre *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus fumigatus* (O'Neil, 1987). Otros estudios mostraron la presencia de reactividad cruzada entre *Fusarium solani* y *Epicoccum nigrum*; ambos inhibieron a *Wallemia sebi* en RAST pero *Wallemia* solo inhibió parcialmente a *Aspergillus fumigatus* (Karlsson-Borga, 1989). También empleando la misma tecnología se encontró reactividad cruzada entre *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Quindos, 1993) y así mismo se han descrito fenómenos de reactividad cruzada entre extractos de medio de cultivo de *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium moniliforme* (Verma, 1994). Shen y cols (1996) mostraron la existencia de reactividad cruzada entre los alérgenos mayores de tres especies de *Penicillium*, y Brower (Brower, 1996) también ha descrito la reactividad cruzada entre *Aspergillus* y *Penicillium*. Kumar y cols (1993) mediante anticuerpos monoclonales frente a antígenos glicoproteicos de *Aspergillus fumigatus*, mostraron la existencia de reactividad cruzada con *Penicillium*, *Candida* y varias especies de *Aspergillus fumigatus*.

Mediante la aplicación de técnicas de secuenciación génica y proteica de alérgenos, se han podido ratificar las similitudes entre distintos componentes antigénicos y epítomos de diferentes especies. Esta similitud génica puede con casi total seguridad, ser la base de la reactividad cruzada y de éste modo se han encontrado alérgenos comunes entre *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum* (Breitenbach, 1995).

6. ALERGENOS FUNGICOS EMERGENTES: *Stachybotrys chartarum*

Las especies de hongos que más frecuentemente se encuentran en el interior de los edificios han sido ampliamente documentadas y corresponden a especies de los géneros *Alternaria* (*A. alternata*), *Cladosporium* (*C. herbarum* y *C. cladosporioides*), *Aspergillus* (*A. fumigatus*) y recientemente se incluye una nueva especie *Stachybotrys chartarum*, perteneciente a la División Deuteromycota, Clase Hypomycetes, Orden Hyphomycetales, Familia Moniliacea y que agrupa los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* (*Pullularia*), *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Stachybotrys* y *Trichothecium*.



Figura 21: Cultivos y morfología de *Stachybotrys chartarum*

Stachybotrys chartarum es uno de los denominados hongos emergentes colonizadores terciarios de los sustratos y se relaciona comúnmente en referencia a los desperfectos inducidos por el agua en los materiales de construcción. Requiere de celulosa como nutriente y de una humedad superior al 90% y temperatura por encima de los 25°C. Habitualmente forma micelios negros y sus colonias se pueden confundir con otras de similares características como *Aspergillus niger*.

El tamaño de sus esporas, entre 7 y 12 μ , es habitualmente retenido tras su inhalación en las vías respiratorias altas.

Al igual que otros géneros y especies de la División Deuteromycota, *Stachybotrys chartarum* ha sido implicado en diversas patologías asociadas al ambiente interior de los edificios y en relación con el índice de contaminación y sus características biológicas:

- Micotoxicosis: los tricotecenos macrocíclicos como verrucarinas B y J, roridina E, satratoxinas e isosatratoxinas F, G y H de ésta especie, han sido extensamente estudiadas en humanos y animales en relación con varias enfermedades. Sus toxinas son consideradas como un importante biocontaminante especialmente en niños.
- Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE: común a la que presentan el resto de especies encuadradas y que pueden ser convencionalmente diagnosticadas mediante pruebas cutáneas y determinación de IgE específica.
- Síndrome del Edificio Enfermo ó SBS (Sick Building Syndrome): La OMS acepta éste síndrome en 1982, con una importante dificultad en la definición del mismo y de los agentes etiológicos implicados, siempre en relación con la mala calidad de las condiciones ambientales en el interior de los edificios (Stolwijk JAJ, 1991) y que atribuye fundamentalmente a la presencia de hongos contaminantes y sus metabolitos (Rao, CY. 2000) y recientemente (Brasel, TL. 2005) discrimina aún más en los conidios y pequeñas partículas como portadoras de micotoxinas de *Stachybotrys chartarum* como agentes contaminantes primarios involucrados en el SBS.

Stachybotrys chartarum cobró notoriedad en la década de los 90 al ser relacionado con una serie de casos de la denominada Hemorragia Pulmonar Idiopática en la ciudad de Cleveland, Ohio (USA), sin embargo la anatomía patológica de los órganos de los niños afectados no mostró evidencia de éste hongo en los tejidos afectados, lo cual sugirió que el mecanismo no era debido a una infección, sino más bien a la acción local de las satratoxinas G y H, que al ser inhaladas interfieren con la síntesis de colágeno IV en los capilares pulmonares, conduciendo a la extravasación sanguínea originando en el aparato respiratorio la hemorragia pulmonar.

6.1 Micotoxicosis

Los tricotecenos son potentes inhibidores de DNA, RNA y de la síntesis de proteínas y concretamente Stachylisina, una potente micotoxina producida por *Stachybotris chartarum* que parece ser una de las responsables de la denominada Hemorragia Pulmonar Idiopática (Vesper, 2002), como causa de su existencia en ambientes interiores de edificios contaminados por *Stachybotrys chartarum*, apoyados en la consideración de los casos de hemosiderosis pulmonar en niños descritos en edificios contaminados por éste hongo (Elidimir, 1999, Flappan 1999) que han llevado al informe del CDC al respecto (CDC 2000).

6.2 Enfermedades alérgicas

Actualmente (Savilhati, R. 2000 y Savilhati, R. 2001) se ha producido un incremento en la preocupación científica de los alergólogos, por los hongos como fuentes de sensibilización primaria en el desencadenamiento de patologías, como el asma y la rinitis y su relación con los centros escolares y edificios, en los que pueden desarrollarse importantes colonizaciones y riesgos de exposición a estas fuentes de sensibilización. La contaminación por hongos en escuelas ha sido estudiada y documentada cualitativa y cuantitativamente (Santilli, J. 2003) concluyendo la importancia de especies entre las que se incluyen *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Stachybotrys* y se concluye que 1.000 esporas/m³ de aire representa un estándar de calidad de aire y como tal se ha promovido la necesidad de implantar medidas de control efectivas de la carga fúngica (Environmental Protection Agency. 2003).

La exposición intranasal a *Stachybotris chartarum* se ha comprobado que incrementa la inflamación de la vía aérea en ratones (Leino 2006) y respuestas ligadas al asma en modelos también animales (Viana 2002). Las proteínas antigénicas de *Stachybotrys chartarum* ha sido estudiado mediante SDS PAGE y su capacidad fijadora de IgG e IgE muestra en ELISA que existe una prevalencia del 49.2% (65 sueros positivos para IgG sobre 132) y del 9.4% (13 sueros positivos sobre 139), identificándose dos proteínas de origen esporo-micelar de 34 y 52 kDa en SDS PAGE inmunoblot (Barnes 2002).

II. OBJETIVOS

Revisados los antecedentes en relación con las enfermedades alérgicas y las fuentes de sensibilización de origen fúngico, se concluye la importancia de conocer los agentes etiológicos implicados en sus manifestaciones patológicas, conforme a los postulados de Thomenn, que considera como requisitos para establecer un criterio de alergenidad:

- Existencia de material biológico activo.
- Producción de grandes cantidades de material biológico activo.
- Permanencia en suspensión durante largo tiempo.

La presencia de fuentes de sensibilización relevantes y disponer de extractos alérgicos de importante relevancia clínica, adecuadamente caracterizados para su empleo en el diagnóstico mediante pruebas cutáneas y detección de IgE específica, son las principales herramientas disponibles que permiten establecer el diagnóstico etiológico de la enfermedad alérgica.

En base a ello el estudio de los aeroalérgenos de origen fúngico y la inclusión de especies en las baterías de diagnóstico, adecuadamente estandarizadas, son el objeto de ésta Memoria y de éste modo se plantean los siguientes objetivos detallados a continuación.

OBJETIVOS

1.- **Seleccionar** las más comunes fuentes de sensibilización de origen fúngico de nuestro entorno (Tarancón. Cuenca. Castilla-La Mancha), incorporando fuentes eventualmente emergentes (*Stachybotrys chartarum*) y procesarlas con el fin de obtener extractos alérgicos para su empleo diagnóstico “in vivo” mediante pruebas cutáneas por Prick Test, y técnicas “in vitro” para investigar la prevalencia de las fuentes de sensibilización y el fenómeno de reactividad cruzada.

2.- **Establecer** los valores analíticos de los distintos extractos alérgicos, así como los perfiles electroforéticos antigénicos (antigenograma) y alérgicos (alergograma) que permitan establecer la presencia de alérgenos comunes inter especie e inter género.

3.- **Estandarizar** biológicamente, mediante pruebas cutáneas el extracto alérgico más representativo de las especies de hongos seleccionadas, definiendo los parámetros convencionales de actividad biológica “in vivo” y potencia alérgica “in vitro”.

4.- **Realizar** estudios serológicos de especificidad de anticuerpos de la clase IgE alérgeno específicos, entre las diferentes especies de hongos evaluando los fenómenos de reactividad cruzada y de polisensibilización mediante técnicas de inhibición de “inmunoblotting” y “ELISA” y técnicas moleculares como la definición de “huella peptídica”.

5.- **Incorporar** la técnica de liberación de histamina a los resultados de la estandarización biológica del alérgeno representativo.

III. MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION Y PROCESADO DE LA FUENTE ALERGÉNICA

1.1 Selección de las fuentes de sensibilización fúngica

Las fuentes naturales de las materias primas conteniendo esporas y micelio fueron suministradas por Allergon (Allergon, Engelholm, Suecia), Greer Lab., Lenoir. USA) y la Cátedra de Parasitología del Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco en Vitoria. España.

Especies fúngicas	Origen
<i>Mucor mucedo</i>	Allergon
<i>Rhizopus sp.</i>	Greer
<i>Candida albicans</i>	Allergon
<i>Alternaria alternata</i>	Allergon
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allergon
<i>Aspergillus niger</i>	Allergon
<i>Botrytis sp.</i>	Greer
<i>Cladosporium herbarum</i>	Allergon
<i>Fusarium sp.</i>	Greer
<i>Penicillium notatum</i>	Allergon
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Allergon
<i>Stemphylium botryosum</i>	Allergon
<i>Trichophyton rubrum</i>	UPV / Allergon
<i>Ulocladium botrytis</i>	UPV

Tabla 3. Fuentes estudiadas

1.2 Homogeneización

Previamente a su homogeneización, las materias primas se disolvieron en tampón de Coca (10 g Cloruro sódico, 4 g de Bicarbonato sódico, 4 mL de Tween 20 y 1 litro de agua desionizada) y ulteriormente se procedió a su homogeneización mediante un proceso de rotura con aspas en un aparato Politron PT 2100 (Kinematica AG) en dos ciclos de 1 minuto a 4°C.

1.3 Extracción

El homogeneizado fue posteriormente sometido a extracción hidrosoluble con tampón de Coca) al que se le añadieron 1µg/mL de pepstatin A (ref L9783, Sigma) 1 µg/mL de leupeptina (P5318, Sigma) y PMSF a 1mM (phenylmethilsulfonyl fluoride) (P7626, Sigma) como inhibidores enzimáticos de proteasas. El proceso se efectuó mediante agitación magnética a una temperatura de 4° C, durante 5 horas.

1.4 Filtración y diálisis

La fracción hidrosoluble se sometió a centrifugación de 8.400 g x 30 min. a 4° C, en una centrifuga Rotanta RS (Hettich), tras la cual se descartó el sedimento.

El sobrenadante obtenido fue sometido a filtrado con vacío, en un conjunto de embudo Buchner y matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore AP (Millipore).

El filtrado obtenido fue sometido a un proceso de diálisis en una membrana con un límite de exclusión de 7.000 Da (Medicell International), durante 12 horas a 4° C frente a agua desionizada

Tras una posterior filtración con un filtro de un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore), se procedió a su congelación a – 80° C, (Sanyo MDF – 235).

1.5 Estabilización

La estabilización se realizó mediante un proceso de liofilización en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Telstar) según una receta específicamente diseñada, cuyas características son expresadas en la tabla nº 1.

DESCRIPCION	TEMPERATURA (° C)	VACÍO (mbar)	h: min.
Preparación bandejas	- 30		
Congelación	- 40		0:30
Congelación	- 40		3:00
Prep. Condensador	- 50		0:10
Vacío Cámara		0.200	
Secado primario	- 5	0.200	5:00
Secado primario	10	0.200	8:00
Secado primario	30	0.300	8:15
Secado primario	30	0.300	7:0
Test final secado primario	30	0.300	0:5
Secado secundario	30		4:0
Secado secundario	30		5:0
Test final secado secundario	30		0.5

Tabla 4: Receta de Liofilización

1.5.1 Determinación de parámetros analíticos

1.5.1.1 Humedad relativa:

La humedad relativa de las muestras liofilizadas, se realizó de acuerdo a la descripción del método de Karl-Fischer; el cual utiliza el reactivo del mismo nombre (originalmente en relación 1:3:10 una mezcla de yodo + dióxido de azufre + piridina en etanol), que al reaccionar cuantitativa y selectivamente con el agua, permite conocer y medir su contenido en la muestra problema. Para ello se empleó un equipo de valoración volumétrica de agua Crison, modelo Compact KF I Titrator (Crison). El procedimiento se realizó sobre la base de los programas definidos por el fabricante y conforme a las especificaciones contenidas en la Real Farmacopea Española (RFE, 1997).

1.5.1.2 Contenido proteico:

El contenido proteico fue valorado mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Su fundamento es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el Azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm, cuando se une a las proteínas. Para ello se empleó el kit “Bio-Rad Protein Assay” (BIO-RAD Lab), que de acuerdo con las instrucciones del fabricante, emplea como recta patrón BSA a diferentes concentraciones (0; 2; 4; 6; 8; 10 µg/mL) sobre la que se compara la muestra y cuyas lecturas se realizan a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Beckman-Coulter DU 640 (Beckman-Coulter).

2 ANTIGENOGRAMAS Y ALERGOGRAMAS**2.1 Determinación de pesos moleculares. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE)****2.1.1 Descripción de la SDS PAGE:**

Básicamente se emplea el método originalmente propuesto por Laemmli (Laemmli, 1970) con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal utilizados para Mini-Protean II (Bio-Rad).

2.1.1.1 Tampones y soluciones:

1.5 M Tris-HCl; pH: 8.8 (Separador)

Tris base	27.23 g (18.15/100 mL)
Agua destilada	150 mL
Ajuste a pH 8.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C.	

0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8 (Apilador)

Tris base	6 g
Agua destilada	100 mL
Ajuste a pH 6.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C	

SDS (dodecilsulfatosódico) al 10%

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

Tampón de tratamiento (“Sample buffer”)

Agua destilada	4 mL
0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
2-β-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL

Tampón de electrodos pH: 8.3 (5X)

Materiales y métodos

Tris base	9 g (15 g/ L)
Glicina	43.2 g (72 g/L)
SDS	3 g (5 g/L)
Agua destilada	600 mL

Almacenamiento a 4° C y se calienta a 37° C si se produce precipitación
Se diluyen 60 mL de tampón stock 5X con 240 mL de agua destilada.

Solución de Azul de Coomassie (Tinción)*

Azul de Coomassie R-250	1 g
Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de tinción: 60 minutos a 50° C o 12 horas a temperatura ambiente.

*si se emplea la tinción propuesta por el fabricante “Biosafe de Coomassie” (Bio-Rad), el gel debe de previamente lavarse 3 veces con agua destilada y añadir posteriormente la tinción, manteniéndola durante 1 hora y desteñir a continuación el gel con agua.

Solución decolorante

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de decoloración: entre 1 y 3 horas.

2.1.1.2 Montaje de las placas:

De acuerdo a las instrucciones del equipo Mini-Protean II dual slab cell

2.1.1.3 Preparación de los geles: Sistema discontinuo

Gel Separador “running gel” (porcentaje de acrilamida 15%) =>cantidad para 2 geles de 0.75 mm

Acrilamida (40%) 29:1	2.45 mL
Tris HCl 1.5 M pH: 8.8	1.7 mL
Agua destilada	2.45 mL
SDS 10%	66 µL
Persulfato amónico (fresco)	70 µL (30 mg/mL)=>3%
Tetrametiletildiamina (TEMED)	14 µL
Cantidad por placa	3.2 mL
Tiempo de polimerización	10 minutos
INTERFASE: 40 µL de Butanol/agua por cada lado de la placa	

* El porcentaje de acrilamida se establece en función del peso molecular de la muestra que es objeto de estudio. Se utiliza un porcentaje de acrilamida del

12,5% cuando la muestra tiene un peso molecular relativo que oscila entre los 15 y los 95 kDa. Cuando la muestra tiene un peso molecular mas elevado se reduce el porcentaje de acrilamida, superando siempre el porcentaje establecido para el gel preparador, y cuando el peso molecular es inferior al anteriormente señalado se aumenta dicho porcentaje.

El grosor del gel se ajusta en proporción a la cantidad de proteína que pongamos, utilizando para este fin cristales diseñados para este uso

Gel Apilador o Concentrador “stacking gel” (porcentaje de acrilamida 4%)=> cantidad para 2 geles de 0.75 mm

Acrilamida	0.7 mL
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.7 mL
Agua destilada	4.2 mL
SDS 10%	66 µL

desgasificación 10 minutos => Polimerización:

Persulfato amónico (fresco)	70 µL
Tetrametilendiamina (TEMED)	14 µL

2.1.1.4 Preparación de las muestras:

Las muestras se disuelven en el tampón de muestra, a una concentración de unos 0,5 a 2 mg/mL de proteína calculada según el método Bradford (Bradford, 1976), llevándose a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Tras su enfriamiento, los restos insolubles se eliminan por centrifugación a 14.000 r.p.m, en una centrifuga Micro (Helltich) durante 5 minutos, descartándose el precipitado.

El patrón de pesos moleculares se recompone así mismo en el tampón de muestra, debiendo previamente a su empleo haber alcanzado los 100° C durante 5 minutos.

2.1.1.5 Condiciones electroforéticas:

Tras el rellenado de la cubeta interior con el tampón de electroforesis y añadiendo el resto a la cubeta; se dispensa el patrón y las muestras en las calles con una pipeta en un volumen de 10 µL. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 200 voltios durante 30 – 45 minutos, en función del frente de migración que presenta el azul de bromofenol. En ese momento se desconecta la fuente y se extrae el gel de entre las dos placas.

2.1.1.6 Tinción:

El gel se coloca en una placa de Petri y se añade la solución colorante de Coomassie, en dos protocolos:

- Rápido: 1 hora a 60 °C

- Lento: 24 horas a temperatura ambiente

El exceso de colorante es retirado mediante la solución decolorante hasta que el fondo del gel quede casi transparente (1 – 3 horas) y puedan ser visualizadas adecuadamente las bandas del patrón y de las muestras.

2.1.1.7 Determinación de Pesos Moleculares:

Se realiza de acuerdo al método propuesto por Weber y Osborn (Webber, 1969), construyendo una recta de calibrado, que representa la movilidad (en mm) de una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (PM conocido). La movilidad se mide desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda.

Una vez demostrada la correlación entre ambas variables ($r > 0.90$), el peso molecular de las proteínas o péptidos de la muestra problema se determina a partir de sus movilidades.

Las proteínas empleadas como patrones, cuando se utilizaron geles al 15% de acrilamida fueron adquiridas a Bio-Rad (Precision Plus Protein Standards) referencia 161-0374 correspondientes a unos estándares de pesos moleculares, que se especifican en la tabla siguiente:

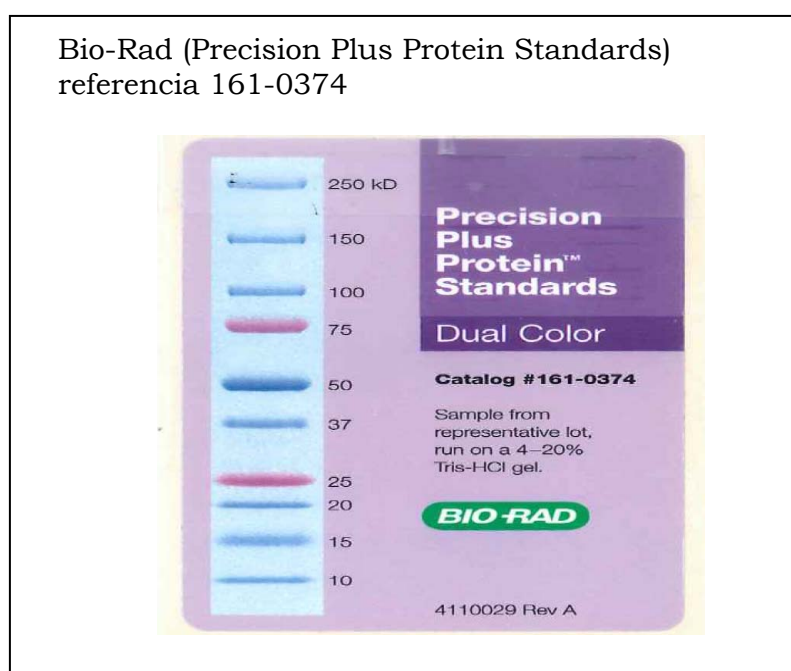


Tabla 5: Estándares de pesos moleculares

2.1.2 Electroforesis en 2D

Preparación de la muestra y primera dimensión

- Las muestras se resuspenden en agua ultra pura, en un volumen de 150 μ L. La masa en proteína depende del tipo de muestra, siendo 150-300 μ g de proteína total en los extractos complejos que se van a teñir con Azul de Coomassie, de 50 a 100 μ g de proteína total en los extractos complejos que se vayan a teñir con Tinción de plata y un total de 3-6 μ g de proteína purificada. Las muestras se agitan durante 10 minutos en vortex, y se centrifugan durante 10 minutos a 13200 rpm.
- Las muestras se precipitan con TCA/Acetona añadiendo el mismo volumen de TCA al 20% que de muestra. Ejemplo: 300 μ L de TCA en 300 μ L de muestra. Incubamos la mezcla 15 minutos a -20°C y centrifugamos a continuación a 12.000 rpm a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se quita cuidadosamente el sobrenadante con la punta de una pipeta evitando coger precipitado. Añadimos 300 μ L de acetona fría y volvemos a centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Eliminamos el sobrenadante y secamos el precipitado.
- Una vez precipitadas las muestras, estas se solubilizan en 150 μ L de **tampón de rehidratación** que está formado por:
Urea 8M
DTT a 50 mM (ditiotreitól)
2% CHAPS (p/v)
0,2% (p/v) Byolite 3/10
- Sacamos la tira de IPG del congelador, añadimos 125 μ L de muestra, para las tiras de IPG de 7 cm. [(Tiras de 3-10 (Biorad, 163-2000)), (Tiras de 5-8 (Biorad, 163-2004))], en la bandeja de la 1ª dimensión. Quitamos en primer lugar el plástico fino de la tira, y depositamos la tira en la bandeja (con la parte de la acrilamida en contacto con la muestra). El Polo positivo de la bandeja con la parte positiva de la tira y lo mismo para el polo negativo. Se deja incubando unos 15-25 minutos.
- Añadimos entre 1,5 - 2 mL de aceite mineral (MINERAL OIL, Biorad, 163-2129) sobre la tira, para que no se produzca la deshidratación de la misma, ya que la separación dura unas 18 horas. Cerramos la bandeja con su tapa.
- Colocamos la bandeja de la 1ª dimensión en los electrodos del aparato, y cerramos.
- Encendemos el aparato y cargamos el método adecuado.
- Una vez que haya terminado la primera dimensión, el aparato aplicará unos 50 mV para que las proteínas no se desenfocan.

Separación de la segunda dimensión

Preparamos los geles de acrilamida al 15% utilizando cristales de 1 mm. Estos geles solamente tienen separador. El peine que se utiliza en el gel, es de tipo

continuo, para acoplar la tira IPG, y cargar el estándar de pesos moleculares en el único pocillo.

- Desconectamos el aparato de IEF y sacar la bandeja de la 1ª dimensión.
- Añadimos 1 mL de **tampón de equilibrado I** en la bandeja de lavado. El tampo de equilibrado I esta formado por:

Urea a 6M
SDS al 2%
Tris-HCl 0,375M pH 8,8
20% de glicerol
- Sacamos la tira de IPG de la bandeja de la 1ª dimensión, escurrimos el exceso de aceite mineral en papel de filtro y depositamos la tira en la bandeja de lavado por la parte de la acrilamida. Incubamos durante 10-15 minutos en agitación rotacional suave.
- Eliminamos el tampón de equilibrado I. Añadimos **tampón de equilibrado II** a la bandeja de lavado. El **tampón de equilibrado II** esta formado por:
Urea 6M
SDS al 2%
Iodocetamida
Tris-HCl 0,375M pH 8,8
20% de glicerol
- Escurrimos la tira IPG en papel de filtro antes de entrar en contacto con el tampón de equilibrado II. Incubamos durante 10-15 minutos en agitación rotacional suave.
- Calentamos agarosa al 20% a unos 35-40 °C (En el microondas, unos 30 segundos aproximadamente).
- Introducimos la tira de IPG en tampón de electrodos, para que se equilibre y pueda conducir la corriente.
- Cortamos la tira IPG de 0,5-1 cm por el polo negativo.
- Colocamos la tira de IPG entre los cristales del gel de la 2ª dimensión. (El plástico está en contacto con el cristal de 1 mm y la acrilamida hacía delante). Introducimos la tira IPG con unas pinzas hasta que entre en contacto con la acrilamida del gel de la 2ª dimensión. El polo positivo va a estar en contacto con el estándar de pesos moleculares.
- Añadimos 2 µL de Precision Plus Protein Standards (Biorad, cat 161-0374) en el único pocillo del gel.
- Añadimos la agarosa para sellar la unión de los dos geles de acrilamida (de la 1ª y 2ª dimensión). Esperamos que la agarosa gelifique antes de empezar la electroforesis.

Condiciones electroforéticas:

Rellenamos la cubeta interior con el tampón de electroforesis y la parte exterior con aproximadamente 200 mL. A continuación se enciende la fuente de alimentación POWER PACK 300 DE BIORAD en las siguientes condiciones:

- Paso 1:

Voltaje: 120 voltios

Tiempo: 20 minutos aproximadamente

- Paso 2:

Voltaje: 150 V

Tiempo: 20 minutos

- Paso 3:

Voltaje: 200 V

Tiempo: 20 minutos aproximadamente. Hasta que el azul de bromofenol del frente del gel se encuentre al final del mismo. Posteriormente se desconecta la fuente y se saca el gel de entre las dos placas.

Para visualizar las proteínas migradas del gel se realiza una **tinción de Coomassie** o una **tinción de Plata**.

2.2 Transferencia de bandas proteicas, separadas por electroforesis a membranas inmovilizantes. Western blot y Western blot inhibición

2.2.1 Descripción. Inmunotransferencia (Western blot)

El empleado en estos experimentos es el método descrito por Towbin (Towbin y cols., 1979), en un equipo de transferencia Bio-Rad compuesto por:

- Mini Trans-blot electrophoretic transfer cell.
- Mini Protean II cell ó Trans-blot semi-dry transfer cell.
- Power Pac 200

2.2.2 Método de transferencia semiseco

- a) Preparación del Tampón de Transferencia (Schafer-Nielsen y cols., 1980) compuesto por:

Glicina 39 mM	5.82 g
Tris 48 mM	2.93 g
SDS 1.3 mM	3.75 mL al 10%
Metanol 20% (v/v)	200 mL
Agua destilada completar hasta	1 L

pH del tampón 9.2; que nunca debe de ajustarse con ácidos o bases y puede almacenarse a 4° C.

b) El gel de poliacrilamida, una vez finalizada su electroforesis, debe de ser equilibrado para retirar las sales y restos de detergente, que incrementarían la conductividad de la transferencia. Para ello el gel de poliacrilamida debe de sumergirse en el tampón de transferencia durante al menos 10 minutos; siempre que su grosor sea de 0.75 mm. Si el gel fuera mas grueso el tiempo seria mayor.

c) La membrana de PVDF y el papel de filtro protean KL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), deben de cortarse 1 o 2 cm mas grande que el gel de poliacrilamida. Dadas las características hidrófobas de la membrana de PVDF, debe de someterse a un pretratamiento de:

Metanol	15 segundos
Agua destilada	1 minuto
Tampón de Transferencia	>2 minutos

d) Colocación de los componentes de la transferencia en la placa del aparato:

En primer lugar el papel de filtro Protean XL size (ref. 1147NF3 Bio-Rad), embebidos en el Tampón de Transferencia. La membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y otro de papel de filtro.

e) La transferencia se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre 10 – 15 V (3 mA/cm^2) y nunca excederá de 25 V. Este valor se obtiene tras la medida del área del gel, que al multiplicarse por la constante 5.5 y dividirse por 1.000, nos indica el número de mA requeridos. El tiempo aproximado de transferencia no debe ser superior a los 45 minutos.

f) Una vez finalizado el proceso de transferencia, se retira la membrana de PVDF, bien para ser teñida o procesada para inmunodetección

2.2.2.1 Tinción de membranas de PVDF transferidas: directa

a) Solución de tinción Negro Amido (Amido Black 10 B; Panreac, al 0.1%):

Amido Negro 10 B	0.2 g
Solución decolorante	200 mL

b) Solución decolorante:

Metanol	900 mL
Ácido acético glacial	20 mL
Agua destilada	80 mL

Se coloca la membrana de PVDF en la solución de tinción durante 10 minutos y posteriormente se traslada la misma a la solución decolorante, hasta que el fondo quede claro. Retiramos en ese momento la membrana y la dejamos secar.

2.2.2.2 Tinción de membranas de PVDF transferidas: reversible

Las membranas pueden así mismo teñirse con la solución de Ponceau, para ello deberán de sumergirse en una solución al 0.5% de rojo Ponceau, 1% de ácido acético durante un minuto y ulterior desteñido con agua destilada hasta conseguir un contraste óptimo. La tinción puede retirarse completamente con una solución de hidróxido sódico 0.1 N.

2.2.3 Inmunodetección de proteínas transferidas a PVDF.

Se procedió de acuerdo al protocolo de Shen (Shen, 1988), con ligeras modificaciones:

- a) Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, la membrana de PVDF se corta en las diversas calles que van a ser incubadas individualmente.
- b) Se procede a un proceso de saturación de la membrana, para evitar las uniones inespecíficas de las inmunoglobulinas o de los conjugados inmunoglobulina – enzima. Para ello, la membrana de PVDF se incubó bien con tampón PBS-Tween 0.1%, bien con BSA 1% PBS-Tween 0.05%, o bien con PBS-leche 3% dependiendo del anticuerpo utilizado, durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente.
- c) Los restos del Tampón de saturación, son eliminados mediante 4 lavados con Tampón PBS de 5 minutos, en agitación constante y a temperatura ambiente.
- d) La incubación de las membranas de PVDF, con el suero de los pacientes, se realiza durante un periodo de 12 – 16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4° C. Los sueros de los pacientes, pueden emplearse individualmente o agrupados “pool”. A nivel de IgE individualizados, los sueros se emplearon diluidos a 1:4 (sueros de clase ≥ 2 en RAST o equivalente).
- d.1) Cuando se realiza una inhibición de la inmunotransferencia, la incubación de la membrana con el “pool” de sueros de los pacientes involucrados se realiza añadiendo el alérgeno inhibidor sobre el mencionado “pool”. En este caso, la mezcla se preincuba durante una hora en agitación constante y a una temperatura de 4° C. A continuación se centrifuga a 14.000 rpm durante 5 minutos para eliminar impurezas para después proseguir con una incubación de 12 – 16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4° C.

Tras la incubación con el suero, los anticuerpos no fijados se eliminan mediante 4 lavados de 5 minutos con Tampón PBS, en condiciones de agitación constante y a temperatura ambiente.

- e) La adición del conjugado anti IgE humana marcada con peroxidasa de rábano (HRP-anti Ig E Dakopatts (ref. P295) o HRP anti IgE Biosource (ref. AH10509), diluida previamente 1:5000 en Tampón PBS-Tween

0.1%; a la membrana de PVDF en un volumen suficiente que la cubra, se realizó manteniéndose durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente.

La utilización de un anticuerpo secundario biotinilado se produjo cuando era necesario aumentar la sensibilidad del experimento. Para ello se utilizó una anti IgE biotinilada Biosource (ref. AH10509) diluida 1:10000 en PBS-Tween 0.1% para los sueros de pacientes sensibilizados. Los anticuerpos se incuban junto con la membrana durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente.

- f) Los conjugados no fijados fueron eliminados, mediante 4 lavados con Tampón PBS, de 5 minutos de duración, en agitación y a temperatura ambiente.
- g) Las membranas que han recibido una incubación con anticuerpos unidos a biotina, se incuban con Estreptavidin-peroxidasa (Sigma S5512) a una dilución 1:1000 de la solución stock que se encuentra a 1 mg/mL, durante 30 minutos

El revelado del inmunocomplejo se realizó empleando el sistema ECL + Plus. Western Blotting detection reagents, ref. NEL104 de Perkin Elmer (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA); mediante el siguiente protocolo:

- a) Extraer los reactivos de la cámara fría y mantenerlos a temperatura ambiente unos minutos antes de su utilización.
- b) Mezclar las soluciones etiquetadas como A y B inmediatamente antes de su uso en una proporción de 1:1.y toda la superficie de la membrana debe de ser cubierta.
- c) El exceso de tampón de lavado se retirará y la membrana debe de colocarse sobre una superficie limpia (un buen soporte es emplear un trozo vidrio); siempre manteniendo e lado que contiene las proteínas adsorbidas hacia arriba.
- d) Retirar el exceso de la mezcla de detección. Es recomendable realizarlo sosteniendo la membrana en posición vertical y dejando así que escurra el líquido. El extremo inferior de la membrana deberá de estar en contacto con un papel secante, con el fin de eliminar el líquido acumulado en el borde inferior.
- e) La membrana debe de colocarse inmediatamente después sobre un pliego de plástico transparente; con la cara que lleva las proteínas adsorbidas hacia arriba, cuidando de retirar muy suavemente las burbujas de aire, que se puedan producir entre el plástico y la membrana. Evitar fundamentalmente la presión sobre la misma.
- f) La membrana envuelta en el plástico con el lado que porta las proteínas adsorbidas hacia arriba, se coloca dentro del cassette de revelado (Hypercassette Amersham Life Science código RPN 13642). Debe de asegurarse que el cassette está totalmente seco. No deben de existir

restos de reactivos humedeciendo la cassette, con el fin de reservar la ausencia de humedad en la película.

- g) En habitación oscura con luz roja de seguridad, colocamos una película de autorradiografía MXG film de Kodak, 100 MIF, 18 x 24 cm (código 525 3356), encima de la membrana. Cerrar el cassette y exponer durante 15 segundos, cuidando de no mover la película durante la exposición. Tras el tiempo de exposición retiramos la película expuesta y colocamos otra sin exponer encima de la membrana. La primera película debe de ser revelada inmediatamente y en función de su resultado, podremos estimar el tiempo que debe de mantenerse en exposición la segunda de las películas, que puede variar entre 1 minuto y 1 hora. Si el tiempo de exposición necesario es menor de 5 segundos, se recomienda diluir los anticuerpos, dada la dificultad de controlar tiempos de exposición tan cortos.

2.3 Evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección

El peso molecular y la intensidad de las distintas bandas pueden ser evaluadas mediante un sistema de tratamiento de imagen, en base al empleo de un densitómetro Bio-Rad, Calibrated Imaging Densitometer GS 710; equipado con un sistema específico de análisis de imagen Bio Rad Diversity Data Base. Mediante éste equipo podemos obtener las imágenes de los geles de electroforesis de poliacrilamida o de las membranas de PVDF y su “escaneo” e integración de datos, nos permite conocer los pesos moleculares de cada banda en función de sus movilidades comparadas respecto del patrón o estándar empleado, haciendo un análisis de regresión lineal entre las variables logaritmo del peso molecular y logaritmo de la movilidad, medido en “pixels”, exigiéndose una correlación $r > 0.90$ entre ambas variables.

En un aspecto semicuantitativo, la intensidad de cada calle o banda puede ser representada como expresión del resultado en intensidad integrada de imagen (densidad óptica por cm^2).

3. COMPORTAMIENTO DE LOS ALERGENOS

El comportamiento, en cuanto a las capacidades fijadoras de Ig E se refiere, de los alérgenos de los extractos de hongos obtenidos, se evaluó mediante el empleo de técnicas de inmunotransferencia, que aportaron además datos de sus características físicas (pesos moleculares en la separación previa electroforética en geles SDS PAGE) (Laemmli, 1970; Towbin y cols., 1979) y mediante técnicas de ELISA.

Para desarrollar las técnicas anteriormente descritas se emplearon sueros de los pacientes admitidos al ensayo de estandarización biológica, que fueron titulados mediante ImmunoCAP, mediante los kits suministrados por IBT Laboratorios. Kansas. USA (Test Code para IgE específica: 782-10 y para IgG específica 782-20).

3.1 ELISA (Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay)

3.1.1 Cuantificación de Alt a1. ELISA doble sándwich

- a) En placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018), se activan con 100 μ L de una solución de anticuerpo monoclonal mAb anti Alt a 1, 121 a 2 μ g/mL en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6, toda la noche a 4°C. Esto es una dilución 1/1000 del stock de anticuerpo (por ejemplo, 10 μ L en 10 mL) ya que este anticuerpo se encuentra a una concentración de 2 mg/mL. Por lo tanto, la concentración de IgG por pocillo será de (0,2 μ g = 200 ng).
- b) Al día siguiente los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 μ L/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- c) La placa se incuba durante 30 minutos con 100 μ L de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% a temperatura ambiente.
- d) Se establecerán las diluciones en función del producto a estudiar (extracto alergénico de *Alternaria alternaria*, *Stemphylium botryosum* y *Ulocladium botrytis*).
- e) Preparación de muestras.
- f) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 μ L/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- g) Se realiza la curva patrón, para la cual se utiliza Alt a 1 standard ST-AA1 que se encuentra a una concentración de 1 μ g/mL. Esta curva tiene que estar comprendida en un rango que empieza en 100 ng/mL a 5.74 ng/mL Alta 1 (dilución 1:10 del stock).
- h) En los pocillos (B1:H1,B2:H2) añadiremos 100 μ L de BSA al 1% en PBS-T al 0.05% y en los pocillos A1 y A2 añadiremos 270 μ L de BSA al 1% en PBS-T al 0,05% junto con los 30 μ L del standard. Se mezclará bien y se transferirán 200 μ L de pocillo a pocillo para efectuar diluciones 1/1.5 hasta los pocillos H1 y H2 respectivamente para hacer 8 diluciones seriadas. Los pocillos G12 y H12 deberán tener 1% de BSA en PBS-T al 0.05 %, como control. Se añaden las muestras preparadas en el paso 5, según la plantilla (100 μ L/pocillo). Las concentraciones del

estándar son: 100 ng/mL, 66,6 ng/mL, 44,4 ng/mL, 29,60 ng/mL, 19,73 ng/mL, 13,15 ng/mL, 8,76 ng/mL, 5,74 ng/mL.

La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

- i) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 µl/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- i) La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µL de anticuerpo monoclonal biotinilado (Anti Alt a 1, 121) a una dilución 1:1000 en BSA 1% en PBS-T al 0.05 %. Este anticuerpo monoclonal se utiliza como segundo anticuerpo.
- j) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 µl/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- k) Se incuban a continuación con 100 µL de una dilución 1/4000 de Estreptavidina-peroxidasa a 1 mg/mL, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La dilución de la Estreptavidina-peroxidasa se hace en 1% de BSA en PBS-T al 0.05%.
- l) Los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tween 0,05%, pH 7.4 (200 µl/pocillo) y se secan sacudiendo la placa contra un pliego de papel de celulosa.
- m) Existen 2 formas de lectura:
 - 1. A cada pocillo se le añaden 100 µL de ABTS (ver PNT-IDABTS) en tampón fosfato-citrato 70 mM, pH 4.2 y H₂O₂ diluida 1/1000 en la solución ABTS. La placa se lee a 405 nm hasta que la absorbancia esté alrededor de 2-2.4 OD en espectrofotómetro de placas Biotek, ID-095. (Según PNT-IDEspectroBiotek).
 - 2. A cada pocillo se le añaden 100 µL de TMB y cuando adquiera un color azulado con una absorbancia leída a 650 nm entorno a 0.6 OD, detenemos la reacción añadiendo 100 µL de ácido sulfúrico 2N. La placa adquirirá un color amarillo y lo leeremos a una longitud de onda de 450 nm en espectrofotómetro de placas Biotek, ID-095. (Según PNT-IDEspectroBiotek)

Cada vez que salga un "report" de la lectura de la placa de ELISA, el operario debe rotular el report según el PNT-IDCDDATPRI, firmarlo y fecharlo.

Las lecturas de absorbancia son directamente proporcionales a la cantidad de Alt a 1 unido, y los valores se extrapolan de la respectiva curva patrón.

3.1.2 ELISA inhibición

- a) El alérgeno en fase sólida lo constituyen los componentes del extracto alérgico del hongo, que se encuentran acoplados a placas microtiter

de poliestireno de 96 pocillos (placa de fondo plano Planounion alta [Tipo I] de poliestireno; COSTAR 15.9018. a una concentración de 250 µg/mL. La placa se mantiene incubando durante doce horas a 4°C.

- b) Tras la incubación se elimina el contenido y se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0,05%
- c) Los alérgenos inhibidores en fase líquida, lo constituyen los componentes de los extractos alérgnicos de la misma especie de hongo (cálculo de la potencia o valor Ag_{50}) o de los diferentes extractos alérgnicos de las especies de hongos seleccionadas. Como control negativo se utilizó el tampón de incubación.
- d) Los sueros empleados corresponden a pacientes con IgE específica a las diferentes especies de hongos seleccionadas y que presentan un nivel de IgE específica de clase ≥ 2 (> 0.7 kU/L).
- e) El método consiste en la preparación de una batería de diferentes concentraciones de las soluciones de los alérgenos inhibidores en tampón de incubación.
- f) A cada tubo se añaden 200 µL de suero, 200 µL de cada una de las concentraciones del alérgeno inhibidor, excepto en un tubo, en el que sólo se añaden 200 µL del tampón de incubación y 200 µL de BSA que corresponde al 100% de unión (0% de inhibición)
- g) Los tubos una vez tapados son preincubados a temperatura ambiente durante tres horas y en agitación orbital.
- h) A cada pocillo se le añaden 100 µL de una solución de bloqueo formada por BSA 1% PBS-Tween 0,05% y se mantienen con dicha solución durante una hora.
- i) Tras tres horas de preincubación se pusieron en cada uno de los pocillos seleccionados, el contenido de los tubos con la fase inhibidora a las diferentes concentraciones, y se mantiene la placa en agitación durante dos horas a temperatura ambiente.
- j) Tras el lavado por 3 veces de cada pocillo con PBS-Tween 0,05%, se seco la placa y se procedió a la adición de 50 µL de una anti IgE humana obtenida en cabra (Biosource cat. AHI0501) a una dilución 1:2000, en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente.
- k) Tras 3 nuevos lavados con PBS-Tween 0,05%, se procedió a la adición de 50 µL de una anti IgG de cabra biotinilada a una dilución 1:5000 (Jackson ImmunoResearch; cat. 705-065-147) en solución de bloqueo durante también 1 hora a temperatura ambiente.

- l) Tras un lavado posterior y la adición de una dilución 1:1000 de estreptavidina-peroxidasa (Sigma cat. S5512) en solución de bloqueo, se mantiene durante una hora a temperatura ambiente.
- m) Finalmente se lavó la placa con 100 µL y se reveló 100 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444, normalmente diluido 1:1 con H₂O). La reacción de color azulado se mide a 650 nm, pero si se añade un volumen igual de ácido sulfúrico 2 N la reacción colorimétrica se para y el color vira a amarillo. La lectura entonces de los valores de absorbancia de la reacción ya parada (amarillo) se consigue en una longitud de onda de 450 nm, y los valores son siempre superiores a los de la reacción de la solución de TMB sin detener.
- n) Las absorbancias de cada pocillo fue obtenida tras la lectura de la placa en un lector Multiskan Acent V1.23.

La recta obtenida con los porcentajes de inhibición de las cinco concentraciones del inhibidor empleadas, se calcula según la siguiente fórmula:

$$100 - (100 \times \text{absorbancia muestra problema} / \text{absorbancia muestra BSA})$$

Una vez obtenida la recta de inhibición, se procede al cálculo de la concentración del alérgeno inhibidor, que produce un 50% de inhibición.

3.2: Cuantificación de los niveles de IgE específica

Las titulaciones de sueros de los alérgenos se realizaron conforme a los valores estandar declarados por el fabricante (ImmunoCAP Phadia. Suecia. y IBT Lab. Kansas USA).

La interpretación de los resultados se realizó conforme a los valores de referencia definidos por el fabricante y que se especifican en la siguiente tabla:

Phadia: ImmunoCAP:		
Suero de referencia KU / L	Clase	Nivel de IgE específica
>100	6	Muy elevado
50 – 100	5	Muy elevado
17.5 – 50	4	Elevado
3.5 – 17.5	3	Alto
0.7 – 3.5	2	Moderado
0.35 – 0.7	1	bajo
0.1-0.35	0	Sensibilizado
<0.1	0	Ausente o indetectable
IBT Laboratories:		
Rangos de unidades y valores normales de referencia en adultos:		
<i>Stachybotrys</i> - IgE específica	< 0.35 kU/L	

Tabla 6: Niveles de Ig E específica y clases

3.2.1 Biotinilización de extractos alergénicos

La biotinilización de las proteínas del extracto alergénico se lleva a cabo mediante el uso del kit “Biotin Protein Labeling” (Roche Applied Science Cat. No. 11 418 165 001)

El kit contiene los siguientes elementos:

3. Solución de bloqueo: Sirve para saturar la columna de Sephadex G-25 y evitar por tanto las uniones inespecíficas de las proteínas a la columna.
4. Tampón fosfato salino (PBS): Sirve para equilibrar la columna de Sephadex G-25 después del bloqueo, para disolver y diluir las proteínas, así como para eluir las una vez que han sido marcadas.
5. Biotin-7-NHS: La Biotin-7-NHS reacciona con los grupos amino libres de las proteínas formando enlaces amida estables.
6. Dimetilsulfóxido (DMSO): Se utiliza como solvente para la Biotin-7-NHS

Preparación de las soluciones:

- a) Solución de bloqueo: Se disuelve el contenido del frasco etiquetado como “blocking solution” en 300 mL de agua ultrapura
- b) Se diluye el contenido de la botella que contiene el PBS en 1L de agua ultrapura
- c) Se prepara la columna de Sephadex G-25 que viene en el kit. La fijamos en un soporte adecuado y cortamos la parte protectora inferior y quitamos la tapa superior
- d) Dejamos en primer lugar fluir la solución de empaquetamiento y añadimos a continuación 5 mL de la solución de bloqueo. Dejamos fluir y equilibramos a continuación con 30 mL de tampón PBS (6 x 5 mL)
Es importante evitar que la columna se seque (si no se va a utilizar en el momento volver a colocar las tapas inferior y superior hasta su utilización)
- e) Marcado con Biotina-7-NHS: Se añaden al vial que contiene 5 mg de D-biotinoyl- ϵ -ácido aminocaproico-N-hidroxisuccinimida ester (Biotin-7-NHS), 250 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose una concentración final de 20 mg/mL.

- f) Se diluyen las proteínas a marcar (extracto alergénico) en un volumen máximo de 1 mL (con volúmenes de entre 0,1 y 0,3 mL se favorece el encuentro entre moléculas de tampón PBS a unan concentración final de entre 5 y 15 mg/mL.
- g) Se añade a la muestra el volumen adecuado de Biotin-7-NHS-DMSO (20 mg/mL) según la tabla adjunta:

M _r protein	Molecular reaction mixture											
	1:5	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60	1:70	1:80	1:90	1:100	1:110
	mg biotin-7-NHS/mg protein [; 0.02 = µl biotin-7-NHS solution (20 mg/ml) ; 0.002 = µl biotin-7-NHS solution (2 mg/ml)]											
10 000	0.227	0.455	0.909	1.364	1.818	2.273	2.727	3.182	3.636	4.091	4.545	5.000
20 000	0.114	0.227	0.455	0.682	0.909	1.136	1.364	1.591	1.818	2.045	2.273	2.500
30 000	0.076	0.152	0.303	0.488	0.686	0.758	0.909	1.081	1.212	1.383	1.818	1.667
40 000	0.057	0.114	0.227	0.341	0.455	0.568	0.682	0.759	0.909	1.023	1.136	1.250
50 000	0.045	0.091	0.182	0.273	0.364	0.455	0.445	0.636	0.727	0.818	0.909	1.000
60 000	0.038	0.076	0.152	0.227	0.303	0.379	0.455	0.530	0.606	0.682	0.758	0.833
70 000	0.032	0.065	0.130	0.195	0.260	0.325	0.390	0.455	0.519	0.584	0.650	0.714
80 000	0.028	0.057	0.114	0.170	0.227	0.284	0.341	0.398	0.455	0.511	0.568	0.625
90 000	0.025	0.051	0.101	0.152	0.202	0.252	0.303	0.354	0.404	0.455	0.505	0.556
100 000	0.023	0.045	0.091	0.136	0.182	0.227	0.273	0.318	0.364	0.409	0.455	0.500
110 000	0.021	0.041	0.083	0.124	0.165	0.207	0.248	0.289	0.331	0.372	0.413	0.455
120 000	0.019	0.038	0.076	0.114	0.152	0.189	0.227	0.265	0.303	0.341	0.379	0.417
130 000	0.017	0.035	0.070	0.105	0.140	0.175	0.210	0.245	0.280	0.315	0.350	0.385
140 000	0.016	0.033	0.065	0.097	0.130	0.162	0.195	0.227	0.260	0.292	0.325	0.357
150 000	0.015	0.030	0.061	0.091	0.121	0.152	0.182	0.212	0.242	0.273	0.303	0.333

Tabla 7: Mezcla de reacción molecular de la biotin-7 NHS

Dado que el extracto alergénico tiene un rango de pesos moleculares de entre los 10 y los 100 kDa, escogemos el de 30 kDa como punto medio. La mezcla de reacción molecular la pondremos a 1:5, por lo tanto cogemos 0,076 mg de biotina por mg de proteína de extracto.

- h) Dejamos mezclar durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación fuerte
- i) Una vez bloqueada y equilibrada la columna de Sephadex G-25 se procede a la elución de las proteínas marcadas con biotina, de forma que pondremos 1 mL (si se ha comenzado con un volumen inferior a 1 mL, enrasar la muestra hasta 1 mL con tampón PBS) de la muestra marcada y la dejamos fluir. A continuación añadimos 2,5 mL de tampón PBS y dejamos fluir.
- j) Eluimos las proteínas marcadas añadiendo a la columna 3,5 mL de PBS. Recogemos fracciones de 0,5 mL (aproximadamente 10 gotas) y medimos las fracciones recogidas a una longitud de onda de 280 nm, reservando las fracciones con mayor absorbancia.

3.2.2 Unión de proteínas marcadas con biotina a fases solidas Estreptavidina InmunoCAP y determinación de la Ig E específica mediante sistema automatizado UniCAP 100®

Se realiza según protocolo de uso del sistema UniCAP 100®.

El acoplamiento de la proteína marcada con biotina a los CAPs de Estreptavidina InmunoCAP se realiza una vez que estos últimos se han colocado en el carrusel del sistema. Se añadirán 50 µL del extracto biotinilado a cada Estreptavidina InmunoCAP y se deja incubar a 37°C durante 30 minutos.

La lectura de los niveles de IgE específica se realizó conforme a los valores de referencia definidos por el fabricante (tabla 8)

4 ESTANDARIZACION BIOLOGICA

4.1 Eficacia diagnóstica

El extracto alergénico se valora biológicamente, mediante el estudio de su reactividad cutánea en pacientes sensibilizados, de acuerdo al método propuesto por Aas (Aas, 1978) y modificado por Malling (Malling, 1987) y conforma con las premisas recogidas en el estudio metodológico de Dreborg (Dreborg, 1984) y que en su conjunto se encuentran preconizadas por la EMEA en su reciente “Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues” (EMEACHMP/BWP/304831/2007) que regula en la CEE éste tipo de productos.

La composición cuali-cuantitativa del extracto alergénico se estableció mediante técnicas inmunoquímicas como ELISA y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE) y posterior inmunodetección (Immunoblotting), utilizando sueros de los pacientes sensibilizados.

La potencia alergénica se estableció mediante la técnica de RAST Inhibición estableciéndose el valor Ag_{50} ; como la concentración de extracto alergénico que induce un 50% de inhibición del RAST; no existiendo en la actualidad estándares internacionales o de referencia admitidos.

4.2 Pruebas cutáneas

Se realizaron según el procedimiento descrito por Osterballe (Osterballe, 1979), en el que la punción se realiza con la lanceta en un ángulo de 90° con la superficie cutánea y a través de la gota de la solución de extracto diagnóstico o del control positivo de clorhidrato de histamina 10 mg/mL; 54.3 mM/L. El contorno de las pápulas obtenidas fue marcado con un rotulador de punta fina (Pilot V5) y transferido mediante una cinta adhesiva transparente a un papel milimetrado para el cálculo de las áreas por planimetría, mediante un programa específico (AUTOCAD), que expresa las superficies en mm².

Las pruebas se realizaron en la cara anterior del antebrazo, por duplicado y disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm. y desde 3 cm. debajo de

la zona de flexión del codo, hasta 5 cm. antes de la zona de flexión de la muñeca. En el antebrazo opuesto y por duplicado y en sentido inverso se realizaron las pruebas de las cuatro diluciones más el control positivo de histamina.

Ningún paciente recibió medicación de interferencia con la sensibilidad cutánea.

Se estableció un valor positivo de la prueba cutánea, cuando el diámetro mayor de la pápula obtenida en cada una de las pruebas se mostró ≥ 3 mm.

4.3 Pacientes

Los pacientes fueron seleccionados aleatoria y prospectivamente en nuestra Consulta de Alergia sobre los siguientes criterios:

- Residencia habitual en nuestro entorno de Castilla – La Mancha.
- Padecer asma y/o rinitis alérgica al menos de 1 año de evolución.
- No haber recibido medicación sintomática o preventiva, al menos un mes antes de ser sometidos a las pruebas cutáneas, que pudiera interferir con los resultados de la prueba cutánea.
- Presentar una prueba cutánea positiva (> 3 mm de pápula) por prick test y un nivel de Ig E específica positivo ($>$ Clase 2. Phadia. ImmunoCAP ó > 0.35 kU/L IBT Laboratories)
- Ausencia de enfermedad importante

5. CARGA ALERGENICA FUNGICA

La carga alérgica fúngica se estableció cualitativamente mediante el análisis de muestras de material orgánico contaminado, obtenida del entorno domiciliario del paciente y enviadas para su clasificación al Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco en Vitoria. España. Así mismo se establecieron sistemas de cuantificación de la contaminación domiciliaria para algunas especies, en base a la demostración cualitativa de la presencia de por ejemplo *Stachybotrys chartarum* y *Aspergillus niger*, mediante un ensayo cromatográfico cromático convencional a partir de muestras domiciliarias denominado Quick Tox Black Model Test kit.

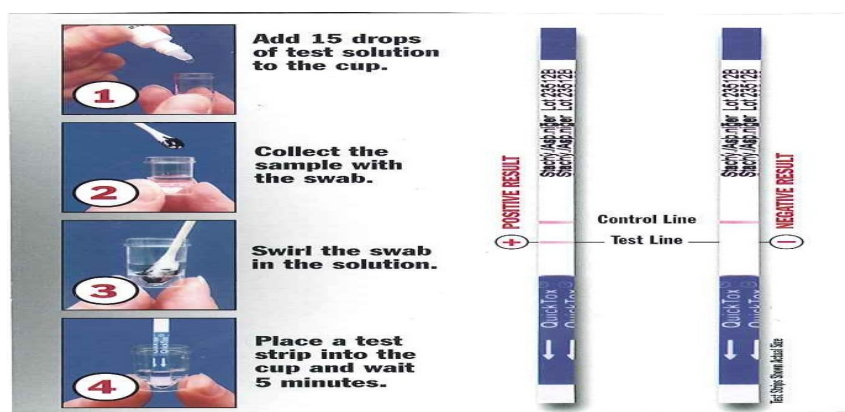


Figura 22: Esquema de uso para detección de *Stachybotrys chartarum*

Mediante éste test es posible detectar la presencia de *Stachybotrys chartarum* y de *Aspergillus niger*, conforme a las especificaciones que muestra el esquema de uso anterior indicado en la Figura 15. La sensibilidad del test muestra una capacidad de límite de detección de niveles de 100.000 esporas/mL de *Stachybotrys chartarum* y de 5.000.000 de esporas/mL de *Aspergillus niger* y no presenta falsos positivos en relación con la detección de otros hongos como *Alternaria*, *Aspergillus flavus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. La interpretación de los resultados del test se realiza conforma a la presencia de bandas y coloración de la misma, según la siguiente clave:

Positivo:

- a) Presencia de dos bandas en la tira cromatográfica.
Bandas rosa (muestra y control) => presencia de *Stachybotrys chartarum*
- b) Presencia de dos bandas en la tira cromatográfica.
Banda gris, marrón o negra en la muestra y banda rosa en el control muestra => presencia de *Aspergillus niger*.

Negativo:

Presencia de una banda en la tira cromatográfica o ninguna banda.

La interpretación de un resultado negativo puede ser así mismo indicativa de un nivel por debajo del de detección del kit.

Para completar la selección de la batería de los hongos aerovagantes más comunes en la zona, se accedió a consultas de la Red de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica.

6. DOT blot

La técnica se desarrolla en el aparato BIO-DOT de BIORAD (96 pocillos) Catalog Number 170-6542, 170-6543.

-

- 72

- k) Una vez que hemos colocado la membrana en el dispositivo 100 mcL de PBS en cada uno de los pocillos que vayan a ser utilizados en nuestro ensayo, de esta forma humectaremos la membrana.
- l) Se conecta el vacío y ponemos la válvula en posición atmosfera y se espera que se filtre todo el PBS. Otra opción sería poner la válvula en posición intermedia y tapar la salida que no esta conectada ni a la bomba de vacío, ni al aparato, para que se haga vacío e ir soltando el dedo poco a poco, hasta que se queden los pocillos totalmente vacíos.
- m) A continuación se dosifican las muestras que componen el ensayo (utilizaremos una plantilla en la que vendrán dispuestas las posiciones de las muestras en los pocillos) en los pocillos a razón de 100 mcL y dejamos que se filtren en posición atmosfera (1 hora aproximadamente)
- n) Se retira la membrana del aparato y se trata con tampón de bloqueo (ver técnica de inmunotransferencia). Los pasos restantes se harán de acuerdo al protocolo de la técnica de inmunotransferencia.

7. TEST DE LIBERACIÓN DE HISTAMINA

El ensayo “histamin release kit” (“HR kit”) se usa para el ensayo de liberación de histamina y se compone de placas y tiras de titulación recubiertas de fibra de vidrio además de un lector de placas (histareader) para la detección de la liberación de histamina de los basófilos humanos.

Los reactivos que proporciona el kit son los siguientes:

- a) Tampón de lavado o “Wash buffer” (solución de SDS en agua al 0.4%)
- b) Reactivo de acoplamiento o “Coupling reagent” (Phtaldialdehído(OPA))
- c) Diluyente para el reactivo de acoplamiento (0,05 mol/L de hidróxido sódico(NAOH))
- d) Solución de parada “stop solution”. (0,59% ácido perclórico (HClO₄))

Tiras:

- a) Tiras con pocillos recubiertos de fibra de vidrio
- b) Tampón Pipes
- c) Viales de preparación (IL-3)

Recolección y almacenaje de las muestras. Preparación del reactivo

La prueba se ha desarrollado para basófilos humanos y solo puede usarse sangre heparinizada. Después de la extracción de sangre, esta última será testada en 36 horas como máximo. Las muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente (20-25°C) hasta que sean testadas.

Las muestras de sangre se pueden usar directamente como sangre completa o lavada como se explica a continuación.

Preparación de las muestras de sangre:

Preparar la sangre heparinizada según estos dos métodos:

Uno u otro

- a) Se mezcla la sangre completa con tampón Pipes (1 mL Pipes buffer + 2 mL de sangre) directamente en vial en que esta la IL-3. Usar la pipeta adecuada.
- b) Se centrifuga la muestra de sangre, se retira el suero y se remplaza por Pipes buffer. A continuación se homogeneiza la muestra invirtiendo el tubo cuidadosamente varias veces. Se transfirieron 3 mL de sangre lavada al vial de preparación (IL-3)

Preparación de los reactivos:

Se añade el contenido del bote de diluyente para “Coupling reagent” [DIL] en la botella del “Coupling reagent” [OPA].

Se disuelve durante 45 (± 10 minutos) y se invierte antes de usar con cuidado*.

*Nota: El disco de la botella de coupling reagent esta recubierto de Phthaldehido. NO esta diseñado para disolverse

Procedimiento de la prueba

Permitir que las placas y los reactivos alcancen una temperatura de unos 20-25°C antes de usarse.

Antes de este procedimiento, las placas o tiras se han incubado con los extractos alérgicos y sangre heparinizada de acuerdo al procedimiento que sigue el kit de liberación de histamina:

Se marcan las tiras con la ID del paciente y se sitúan y ajustan sobre el marco

A continuación se siguen los pasos siguientes:

- a) Se Pipetea 25 μ L de tampón Pipes dentro de cada pocillo
- b) Se Pipetea 25 μ L de sangre dentro de cada pocillo (cubrir con una tapadera)
- c) Se Incuba la placa durante 50-80 minutos a 37°C (36-38)
- d) Se Lavan los pocillos con agua destilada 3 veces. Si el lavado es manual se sacude cuidadosamente la placa bocabajo después de cada lavado.
- e) Se añaden 150 μ L de tampón de lavado [wash] en cada pocillo
- f) Se incuba durante 30 (± 10 minutos) a 37°C (36-38°C)

- g) Se vacía el tampón de lavado [wash] dentro del sumidero de residuos
- h) Se lavan las tiras con agua destilada 3 veces. Si el lavado es manual se sacude cuidadosamente la placa bocabajo después de cada lavado.
- i) Se pipetea 75 µL de coupling reagent [OPA] dentro de cada pocillo.
- j) Tiempo de reacción: 10 minutos. **Nota. Este tiempo debe ser atendido con PRECISION.**
- k) Se para la reacción con 75 µL de Stop solution [STOP] en cada pocillo
- l) Se leen los resultados en el lector de placas (según las instrucciones o el manual del lector Histareader)

Control de calidad

Una **fase de calibración** (RLA 216) se realiza simultáneamente al procedimiento de la prueba para supervisar los niveles mínimos y máximos de la histamina así como la linealidad. Los límites aparecen en el manual del lector Histareader.

Resultados.

Los resultados están basados en un sistema de clasificación que usa clase 0, 1, 2 y 3 y cubre el sistema de clasificación usado por los estándares de alérgenos de RefLab

La clasificación está basada en la mínima concentración de alérgeno capaz de inducir una liberación de histamina significativa.

Clasificación

Una liberación significativa es definida como una respuesta mayor que el valor de corte (cut off value). El cut off value es definido como el valor de fondo (background) +28%.

$FU_{actual} \geq (FU0 + 28\% \text{ of } FU0)$ donde FU son unidades de fluorescencia (FU0 es el FU del pocillo D)

$FU0 + 28\%$ es el valor de corte y el mínimo valor será $(FU0 + 20)$

Se debe poner atención a posibles “outliers” (en estadística un outlier es una observación que numéricamente dista del resto de los datos) en el pocillo D que afectaría al cálculo del valor de corte sobre el que está basado el sistema. Una corrección de datos puede ser necesaria. Cuando el cut off es calculado, el número de concentraciones con una reacción positiva puede ser visto en base a una clasificación determinada. Una respuesta positiva sobre dos concentraciones de alérgeno consecutiva se hace necesaria para dar con una clasificación positiva.

Si no hay respuesta de la anti-IgE y los alérgenos los resultados son inconclusos.

HR-Class 0: Respuesta anti_IgE positiva y respuesta de alérgenos negativa.

HR-Class 1: Las dos respuestas (anti-IgE y alérgeno) son positivas (All 2)
 HR-Class 2: Respuesta positiva sobre All2, All3 o All2, All3, All4 o All3, All4.
 HR Class 3: Respuesta positiva sobre All2, All3, All4, All5 o All3, All4, All5

Composition strip kit:

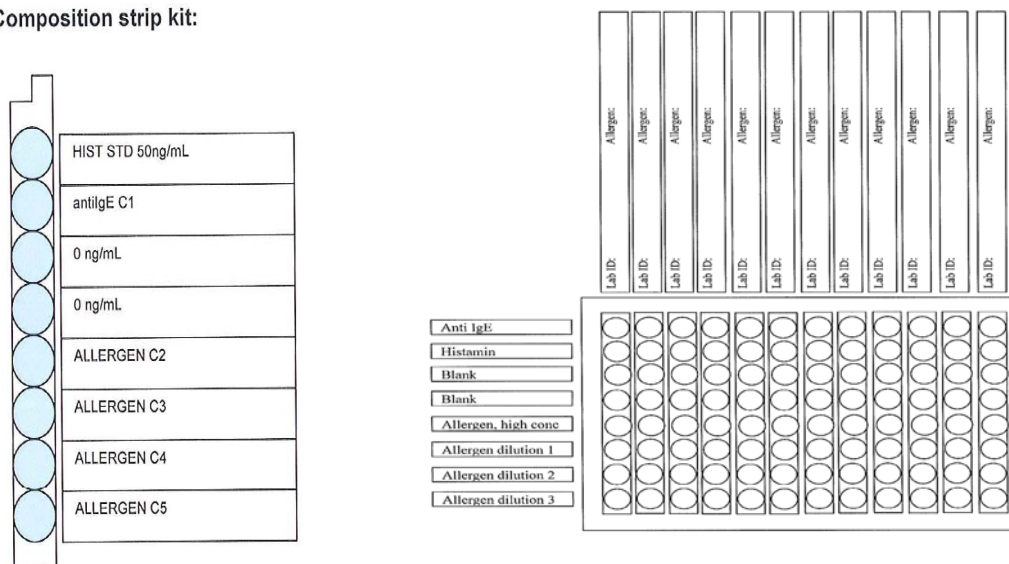


Figura 23. Composición de la tira del test de liberación de histamina

8. IDENTIFICACION DE ALERGENOS. ANALISIS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

La identificación de proteínas con capacidad fijadora de IgE específica se marcaron sobre el gel de poliacrilamida teñido con tinción de Coomassie. La proteína marcada se extrajo de forma manual desde el gel utilizando una punta de pipeta.

La digestión de las proteínas seleccionadas para el análisis se realizó de acuerdo al método de Shevchenko (2006)

Los puntos seleccionados se lavaron dos veces con agua, se redujeron 15 min con 100% de acetonitrilo y se dejaron secar en un tubo concentrador (Savant SpeedVac®) durante 30 min.

A continuación, las muestras se redujeron con dithioerytritol 10 mM en bicarbonato amonico 25 mM durante 30 min a 56 ° C y posteriormente se alquilaron con yodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico de 15 minutos en la oscuridad.

Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12,5 ng/ μ L de tripsina (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8,5) durante toda la noche a 37 ° C.

Después de la digestión, se recogió el sobrenadante y se puso 1 μ L sobre una placa para técnica de espectrometría de masas y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

A continuación se añadieron 0,4 μ L de ácido α -ciano-4-hidroxi-transcinnámico a 3 mg/mL (Sigma) en acetonitrilo al 50% sobre el péptido digerido y se dejó secar de nuevo con aire seco a temperatura ambiente.

El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) se realizó en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canadá) en el Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

El MALDI-TOF/TOF operó en modo reflector positivo a un voltaje de aceleración de 20000 V.

Todos los espectros de masas se calibraron internamente mediante péptidos procedentes de la digestión de tripsina.

El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se estableció de forma que los péptidos observados con una señal a ruido mayor de 10 pudieran ser recogidos y representados como una lista de pesos moleculares monoisotópicos.

Las proteínas que tras su identificación revelaban una huella peptídica poco homogénea, se sometieron a un análisis de secuenciación MS/MS.

Para la identificación de las proteínas, se utilizó la base de datos del NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los criterios de búsqueda se hicieron con la restricción de la taxonomía para hongos (1276566 secuencias) mediante MASCOTA 2,3 (www.matrixscience.com) a través del Servidor Global Protein v3.6 de ABSciex.

IV. RESULTADOS

1. SELECCIÓN DE ESPECIES DE HONGOS:

Cumpliendo con el punto primero de los objetivos, procedimos a la selección de la batería de hongos para el estudio de la hipersensibilidad inmediata. Para ello consideramos fuentes eventualmente emergentes (Ana de, 2006) a aquellas especies que presentan una mayor prevalencia (Zock, 2002), basándonos siempre en consultas a la Red de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (<http://www.polenes.com/>) y ciñéndonos al área geográfica de Cuenca y Tarancón. De esta manera, la batería estaba compuesta por las siguientes especies:

Phycomycetes

- *Mucor mucedo*
- *Rhizopus sp.*

Levaduras:

- *Candida albicans*

Deuteromycetes (hongos imperfectos)

- *Alternaria alternata*
- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus niger*
- *Botrytis sp.*
- *Cladosporium herbarum*
- *Fusarium sp.*
- *Penicillium notatum*
- *Stachybotrys chartarum*
- *Stemphylium botryosum*
- *Trichophyton rubrum*
- *Ulocladium botrytis*

2. PERFIL ANALÍTICO DE LOS EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE HONGOS:

Con el fin de caracterizar analíticamente los distintos extractos, se procedió a cuantificar el contenido proteico de los extractos mediante el método Bradford, conforme a lo detallado en el apartado de materiales y métodos.

En todos los casos el rendimiento de la extracción de proteína se mantuvo en los márgenes convencionales a los neumoaérgenos (2.5-16 % de proteína)

El siguiente cuadro muestra los resultados de los perfiles analíticos de cada una de las especies de hongos seleccionados:

Especie	Origen	Contenido proteico (Bradford)
<i>Mucor mucedo</i>	Allergon	25.9 mg/g
<i>Rhizopus sp.</i>	Greer	28.7 mg/g
<i>Candida albicans</i>	Allergon	161.9 mg/g
<i>Alternaria alternata</i>	Allergon	41.8 mg/g
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allergon	41.9 mg/g
<i>Aspergillus niger</i>	Allergon	91.3 mg/g
<i>Botrytis sp.</i>	Greer	115.6 mg/g
<i>Cladosporium herbarum</i>	Allergon	24.5 mg/g
<i>Fusarium sp.</i>	Greer	79.2 mg/g
<i>Penicillium notatum</i>	Allergon	43.7 mg/g
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Allergon	61.4 mg/g
<i>Stemphylium botryosum</i>	Allergon	66.9 mg/g
<i>Trichophyton rubrum</i>	UPV/Allergon	56.9 mg/g
<i>Ulocladium botrytis</i>	UPV	32.0 mg/g

Tabla 8: patrones analíticos de los extractos alérgicos de hongos

3. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS ALÉRGICOS DE HONGOS:

Una vez realizada la cuantificación del contenido proteico de las distintas especies, se procedió a la determinación del perfil proteico en condiciones reductoras y no reductoras.

Las siguientes figuras muestran los antigenogramas, realizados mediante electroforesis SDS PAGE de los extractos alérgicos seleccionados:

3.1 Condiciones no reductoras:

La siguiente figura, obtenida con tinción de azul de Coomassie R-250 y siguiendo la técnica detallada en el punto 2 del apartado de Materiales y Métodos, muestra el patrón de pesos moleculares en condiciones no reductoras

El patrón de los pesos moleculares (WM) correspondientes a las distintas bandas separadas en las calles del gel, muestran los tamaños moleculares de las mismas

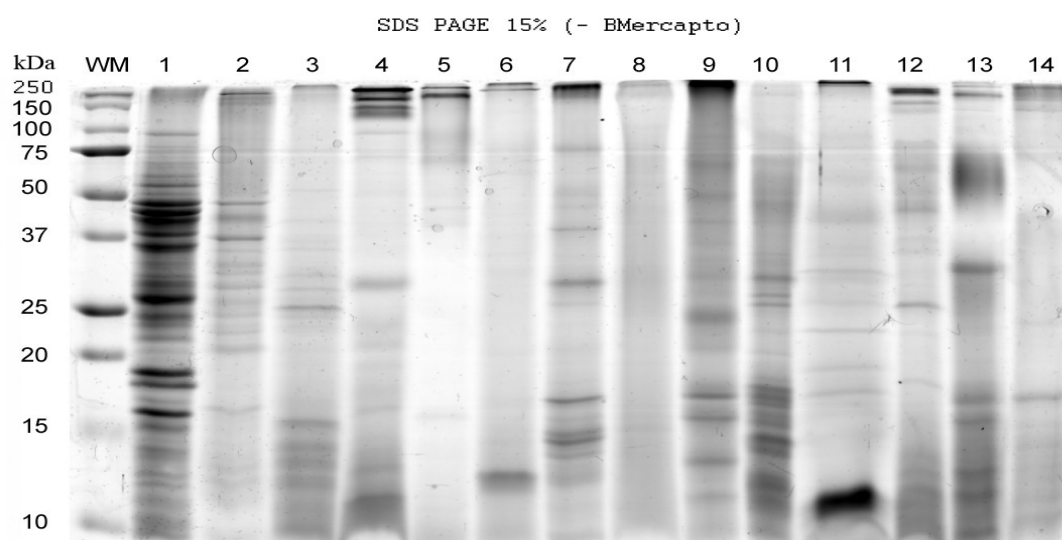


Figura 24: Antigenograma de extractos alérgenos de hongos.

Calle 1: *Candida albicans*; Calle 2: *Ulocladium botrytis*; Calle 3: *Mucor mucedo*, Calle 4: *Fusarium sp.*; Calle 5: *Trichophyton rubrum*; Calle 6: *Aspergillus niger*; Calle 7: *Alternaria alternata*; Calle 8: *Stachybotrys chartarum*; Calle 9: *Stemphylium botryosum*; Calle 10: *Penicillium notatum*; Calle 11: *Rhizopus sp.*; Calle 12: *Aspergillus fumigatus*; Calle 13: *Botrytis sp.*; Calle 14: *Cladosporium herbarum*.

3.2 Condiciones reductoras:

La siguiente figura, obtenida con tinción de azul de Coomassie R-250 y siguiendo la técnica detallada en el punto 2 del apartado de Materiales y Métodos, muestra el patrón de pesos moleculares en condiciones reductoras

El patrón de los pesos moleculares (WM) correspondientes a las distintas bandas separadas en las calles del gel, muestran los tamaños moleculares de las mismas

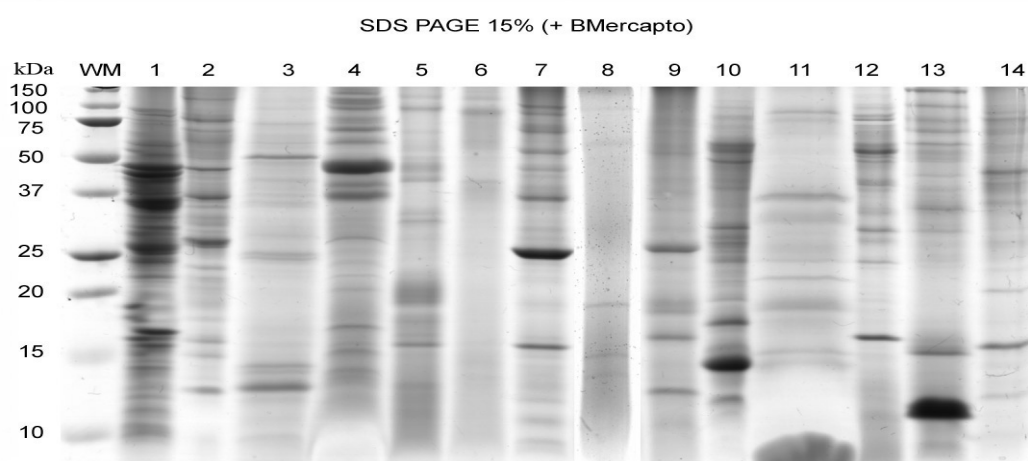


Figura 25: Antigenograma de extractos alérgenos de hongos

Calle 1: *Candida albicans*; Calle 2: *Ulocladium botrytis*; Calle 3: *Mucor mucedo*, Calle 4: *Fusarium sp.*; Calle 5: *Trichophyton rubrum*; Calle 6: *Aspergillus niger*; Calle 7: *Alternaria alternata*; Calle 8: *Stachybotrys chartarum*; Calle 9: *Stemphylium botryosum*; Calle 10: *Penicillium notatum*; Calle 11: *Rhizopus sp.*; Calle 12: *Aspergillus fumigatus*; Calle 13: *Botrytis sp.*; Calle 14: *Cladosporium herbarum*.

4. SELECCIÓN DE ESPECIE DE MAYOR PREVALENCIA:

La selección de las especies de hongos de mayor prevalencia se realizó en función de la historia clínica sugestiva de sensibilización a hongos, la identificación de la fuente sensibilizante interior domiciliaria, las pruebas cutáneas realizadas y la determinación de Ig E específica tal y como muestra la tabla 9.

NÚMERO	EDAD (1)	SEXO (2)	PATOLOGÍA (3)	TIEMPO (4)	ÁREA (5)	SENSIBILIZACIÓN (6)
1	7	M	RINITIS Y ASMA	2	TARANCON	Alt y Ulo
2	8	M	RINITIS Y ASMA	2	TARANCON	Alt y Ulo
3	16	M	RINITIS	4	TARANCON	Alt, Asp y Ulo
4	15	F	RINITIS Y ASMA	6	TARANCON	Alt y Ulo
5	8	M	RINITIS Y ASMA	3	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
6	15	F	RINITIS Y ASMA	4	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
7	11	F	RINITIS Y ASMA	5	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
8	12	M	RINITIS Y ASMA	4	TARANCON	Alt y Ulo
9	11	M	RINITIS Y ASMA	2	TARANCON	Alt y Ulo
10	14	M	RINITIS Y ASMA	7	TARANCON	Alt y Ulo
11	14	M	RINITIS Y ASMA	5	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
12	19	M	RINITIS Y ASMA	7	TARANCON	Alt, Asp y Ulo
13	14	F	RINITIS	3	TARANCON	Alt y Ulo
14	17	M	RINITIS	4	TARANCON	Alt y Ulo
15	14	F	RINITIS Y ASMA	7	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
16	18	F	RINITIS Y ASMA	3	TARANCON	Alt, Asp y Ulo
17	18	M	RINITIS Y ASMA	6	TARANCON	Alt y Ulo
18	20	M	RINITIS Y ASMA	7	TARANCON	Alt y Ulo
19	11	M	RINITIS Y ASMA	7	TARANCON	Alt y Ulo
20	11	F	RINITIS Y ASMA	5	TARANCON	Alt, Asp, Clad y Ulo
21	16	F	RINITIS Y ASMA	4	TARANCON	Alt y Ulo
22	15	F	RINITIS Y ASMA	3	TARANCON	Alt y Ulo
23	22	M	RINITIS Y ASMA	4	TARANCON	Alt y Ulo
24	11	M	RINITIS Y ASMA	2	TARANCON	Alt y Ulo
25	32	M	RINITIS Y ASMA	5	TARANCON	Alt, Asp y Ulo
26	10	M	RINITIS Y ASMA	3	CUENCA	Alt y Ulo
27	12	F	RINITIS Y ASMA	3	CUENCA	Alt y Ulo
28	21	F	RINITIS Y ASMA	4	CUENCA	Alt, Asp, Clad y Ulo
29	16	M	RINITIS Y ASMA	3	CUENCA	Alt y Ulo
30	20	M	RINITIS	5	CUENCA	Alt y Ulo
31	19	F	RINITIS Y ASMA	3	CUENCA	Alt y Ulo
32	8	M	RINITIS Y ASMA	2	CUENCA	Alt y Ulo
33	26	F	RINITIS	3	CUENCA	Alt y Ulo
34	16	F	RINITIS Y ASMA	5	CUENCA	Alt, Asp, Clad y Ulo
35	11	M	RINITIS Y ASMA	3	CUENCA	Alt, Asp, Clad y Ulo

(1) Edad del paciente expresada en años.

(2) M= Masculino; F= Femenino.

(3) Entidad clínica presentada por el paciente.

(4) Años de evolución de la enfermedad.

(5) Localidad de residencia.

(6) Especies de hongos a los que el paciente tiene prueba cutánea positiva (prick test) y/o IgE específica >0,70 kU/L. Alt= *Alternaria alternata*; Asp= *Aspergillus fumigatus*; Clad= *Cladosporium herbarum*; Ulo= *Ulocladium brottritis*

Tabla 9. Descripción clínica de los pacientes.

Para ello, nos desplazamos a los domicilios particulares o áreas de trabajo/estudio de los pacientes, y procedimos a la recogida de muestras del material orgánico contaminado que podían visualizarse macroscópicamente como compatibles con crecimiento fúngico. Las muestras fueron procesadas previamente y enviadas previo cultivo en medio Saboraud al Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco en Vitoria, España para su identificación



Figura 26. Ejemplo de lugares de recogida de muestras domiciliarias



Figura 27. Cultivo de la muestra en Agar Saboraud

Como puede verse en la tabla 11 las especies más rutinariamente clasificadas fueron *Ulocladium botrytis* y *Alternaria alternata*, que se corresponden con los datos recogidos en bibliografía de fuentes de sensibilización interior domiciliaria, especies, que presentaron el mayor grado de concordancia con las pruebas cutáneas, la Ig E específica positiva y la liberación de histamina.

5. ESTANDARIZACION BIOLOGICA:

Con el fin de definir los parámetros convencionales de actividad biológica “in vivo” y potencia alergénica “in vitro” del extracto de *Ulocladium botrytis* se realizó la estandarización biológica, definida conforme a lo expresado en el apartado 4.2 de materiales y métodos y a las consideraciones incluidas sobre las pruebas cutáneas (Dreborg 1984), tal y como se muestra a continuación.

La tabla 10 y 11 muestra los resultados de las mediciones de las áreas de las pápulas obtenidas a diferentes concentraciones (10, 1, 0,1 y 0,01 mg/mL) del extracto alergénico de *Ulocladium botrytis* y su referenciación con la pápula obtenida con histamina clorhidrato 10 mg/mL como control positivo. Las determinaciones de Ig E específica frente a *Ulocladium*, se realizaron mediante el sistema comercial ImmunoCAP (Phadia. Suecia) frente a la especie *Ulocladium chartarum* y con el extracto alergénico de *Ulocladium botrytis*, cuyos resultados, expresados en clases y unidades kU/L, también se encuentran incluidos en la mencionada tabla.

De los 35 pacientes seleccionados y cuyas características están tabuladas en las tablas 10 y 11, fueron excluidos 9 pacientes (filas en amarillo) y por consiguiente fueron incluidos 26 (suficientes en términos cuantitativos conforme al método de estandarización propuesto y admitido por la EMA) debido a la aplicación de los criterios de inclusión de pacientes en relación con las pápulas obtenidas en las pruebas cutáneas por prick test, con diferentes concentraciones del extracto alergénico:

- Pápulas mayores de 3 mm. de diámetro mayor
- Pápula de mayor concentración de extracto superior a la de histamina

El cálculo del valor HEP (histamina equivalente medido por prick) del extracto alergénico, se realizó sobre la base del cálculo del logaritmo de la media geométrica de los valores directo e inverso de las áreas de pápula provocada por cada una de las concentraciones del extracto, e interpolando sobre la curva de estos valores, el logaritmo de la media geométrica del área de la pápula de la histamina para cada uno de los pacientes, tal y como se indica en la tabla 14. Tras el cálculo de la mediana de los valores HEP de todos los pacientes, se obtuvo el valor HEP para el extracto alergénico de *Ulocladium botrytis*. De éste modo se fijan como límites de confianza para el 95% de la población, los valores de HEP entre los pacientes admitidos y admitidos como 8 y 19.

Resultados

En resumen el valor HEP obtenido entre los 26 pacientes seleccionados se corresponde con un valor de 1.25 mg/mL del extracto de *Ulocladium botrytis*, tal y como se expresa en la tabla 12.

	Log con						
	1,00	0,00	-1,00	-2,00			
	Concentraciones Ulocladium (mg/mL)				Histamina	IgE Ulo b	IgE Ulo c
Paciente	10	1	0,1	0,01			
Paciente 1	50,03	15,19	6,48	0,60	10,90	5,36	1,10
	38,15	10,11	11,58	1,00	28,50		
Media P 1	43,69	12,39	8,66	0,77	17,63		
Log MG 1	1,64	1,09	0,94	-0,11	1,25	Clase 3	Clase 2
Paciente 2	20,62	12,27	2,27	1,00	21,00	5,15	0,79
	18,05	4,31	3,83	1,00	11,72		
Media P 2	19,29	7,27	2,95	1,00	15,69		
Log MG 2	1,29	0,86	0,47	0,00	1,20	Clase 3	Clase 2
Paciente 3	108,87	63,70	24,03	19,38	28,76	1,33	0,90
	36,42	20,24	20,03	9,85	25,20		
Media P 3	62,97	35,91	21,94	13,82	26,92		
Log MG 3	1,80	1,56	1,34	1,14	1,43	Clase 2	Clase 2
Paciente 4	40,99	10,86	6,29	1,00	8,75	5,54	0,91
	41,30	9,13	5,95	3,20	12,46		
Media P 4	41,14	9,96	6,12	1,79	10,44		
Log MG 4	1,61	1,00	0,79	0,25	1,02	Clase 3	Clase 2
Paciente 5	60,6	23,02	10,88	4,33	33,58	7,39	1,55
	42,61	33,50	15,32	4,69	17,51		
Media P 5	50,82	27,77	12,91	4,51	24,25		
Log MG 5	1,71	1,44	1,11	0,65	1,38	Clase 3	Clase 2
Paciente 6	139,34	68,00	11,89	2,84	39,00	1,21	1,01
	61,72	36,27	12,06	8,81	46,60		
Media P 6	92,74	49,66	11,97	5,00	42,63		
Log MG 6	1,97	1,70	1,08	0,70	1,63	Clase 2	Clase 2
Paciente 7	58,07	21,78	7,47	5,40	28,56	0,89	0,90
	50,95	34,18	10,44	9,62	17,06		
Media P 7	54,39	27,28	8,83	7,21	22,07		
Log MG 7	1,74	1,44	0,95	0,86	1,34	Clase 2	Clase 2
Paciente 8	34,19	19,36	9,65	5,07	33,81	0,12	0,12
	34,23	24,22	9,17	6,88	43,42		
Media P 8	34,21	21,65	9,41	5,91	38,31		
Log MG 8	1,53	1,34	0,97	0,77	1,58	Clase 0	Clase 0
Paciente 9	62,20	25,23	9,44	1,00	40,27	6,64	2,43
	47,26	23,84	19,42	1,00	26,32		
Media P 9	54,22	24,53	13,54	1,00	32,56		
Log MG 9	1,73	1,39	1,13	0,00	1,51	Clase 3	Clase 2
Paciente 10	132,94	64,11	14,85	8,92	37,70	1,01	0,70
	120,86	48,48	21,00	1,00	38,63		
Media P 10	126,76	55,75	17,66	2,99	38,16		
Log MG 10	2,10	1,75	1,25	0,48	1,58	Clase 2	Clase 2
Paciente 11	45,79	22,54	16,32	1,00	22,60	1,22	0,97
	42,90	27,04	18,39	12,91	25,22		
Media P 11	44,32	24,69	17,32	3,59	23,87		
Log MG 11	1,65	1,39	1,24	0,56	1,38	Clase 2	Clase 2
Paciente 12	39,74	27,76	16,63	1,00	28,11	0,12	0,12
	31,26	14,81	14,36	1,00	26,07		
Media P 12	35,25	20,28	15,45	1,00	27,07		
Log MG 12	1,55	1,31	1,19	0,00	1,43	Clase 0	Clase 0
Paciente 13	48,55	38,13	17,31	1,00	24,27	0,31	0,30
	50,09	32,31	21,23	18,04	45,30		
Media P 13	49,31	35,10	19,17	4,25	33,16		
Log MG 13	1,69	1,55	1,28	0,63	1,52	Clase 0	Clase 0
Paciente 14	36,47	16,54	10,68	7,55	43,50	1,85	2,09
	102,86	30,34	22,94	11,31	44,09		
Media P 14	61,25	22,40	15,65	9,24	43,79		
Log MG 14	1,79	1,35	1,19	0,97	1,64	Clase 2	Clase 2
Paciente 15	84,20	37,27	7,30	3,45	24,09	2,24	3,86
	34,10	21,17	13,83	4,42	28,36		
Media P 15	53,58	28,09	10,05	3,90	26,14		
Log MG 15	1,73	1,45	1,00	0,59	1,42	Clase 2	Clase 3

Tabla 10. Valores de áreas de pápula e Ig E específica *Ulocladium botrytis*

Paciente 15	84,20	37,27	7,30	3,45	24,09	2,24	3,86
	34,10	21,17	13,83	4,42	28,36		
Media P 15	53,58	28,09	10,05	3,90	26,14		
Log MG 15	1,73	1,45	1,00	0,59	1,42	Clase 2	Clase 3
Paciente 16	74,47	26,63	11,78	7,08	46,60	3,24	1,45
	34,23	20,19	19,89	3,03	32,40		
Media P 16	50,49	23,19	15,31	4,63	38,86		
Log MG 16	1,70	1,37	1,18	0,67	1,59	Clase 2	Clase 2
Paciente 17	26,16	17,71	15,49	1,00	25,86	1,14	0,79
	38,29	17,29	7,77	1,00	24,16		
Media P 17	31,65	17,50	10,97	1,00	25,00		
Log MG 17	1,50	1,24	1,04	0,00	1,40	Clase 2	Clase 2
Paciente 18	146,91	50,16	15,91	10,26	39,14	0,75	0,74
	64,40	46,00	17,49	9,23	50,10		
Media P 18	97,27	48,03	16,68	9,73	44,28		
Log MG 18	1,99	1,68	1,22	0,99	1,65	Clase 2	Clase 2
Paciente 19	43,48	16,94	4,20	1,00	26,72	3,77	7,74
	37,48	27,64	3,97	1,00	22,96		
Media P 19	40,37	21,64	4,08	1,00	24,77		
Log MG 19	1,61	1,34	0,61	0,00	1,39	Clase 3	Clase 3
Paciente 20	47,80	23,17	9,35	1,00	40,80	5,70	2,48
	57,46	26,19	17,22	1,00	46,31		
Media P 20	52,41	24,63	12,69	1,00	43,47		
Log MG 20	1,72	1,39	1,10	0,00	1,64	Clase 3	Clase 2
Paciente 21	48,40	26,25	16,60	1,00	30,49	0,81	0,92
	40,33	34,27	16,06	6,96	16,77		
Media P 21	44,18	29,99	16,33	2,64	22,61		
Log MG 21	1,65	1,48	1,21	0,42	1,35	Clase 2	Clase 2
Paciente 22	84,92	49,39	18,55	1,00	29,86	0,49	0,37
	61,43	39,14	26,26	9,59	45,71		
Media P 22	72,23	43,97	22,07	3,10	36,94		
Log MG 22	1,86	1,64	1,34	0,49	1,57	1,00	1,00
Paciente 23	62,29	28,34	8,39	8,62	18,37		
	56,50	14,66	9,43	8,12	36,08		
Media P 23	59,32	20,38	8,89	8,37	25,74		
Log MG 23	1,77	1,31	0,95	0,92	1,41		
Paciente 24	37,75	29,94	19,46	1,00	15,38	21,20	3,11
	40,55	21,25	3,51	1,00	19,24		
Media P 24	39,12	25,22	8,26	1,00	17,20		
Log MG 24	1,59	1,40	0,92	0,00	1,24	Clase 4	Clase 2
Paciente 25	58,01	31,31	14,94	1,00	26,05	1,52	0,71
	71,07	18,88	20,73	1,00	36,33		
Media P 25	64,21	24,31	17,60	1,00	30,76		
Log MG 25	1,81	1,39	1,25	0,00	1,49	Clase 2	Clase 2
Paciente 26	59,46	35,54	7,40	6,58	19,56	24,10	9,81
	73,33	32,84	7,12	1,00	43,38		
Media P 26	66,03	34,16	7,26	2,57	29,13		
Log MG 26	1,82	1,53	0,86	0,41	1,46	Clase 4	Clase 3
Paciente 27	45,61	26,71	9,58	1,00	23,10	2,65	2,10
	33,43	19,48	8,27	7,68	20,84		
Media P 27	39,05	22,81	8,90	2,77	21,94		
Log MG 27	1,59	1,36	0,95	0,44	1,34	Clase 2	Clase 2
Paciente 28	50,29	15,56	6,16	1,00	24,64	2,43	2,03
	37,27	20,50	3,53	1,00	42,49		
Media P 28	43,29	17,86	4,66	1,00	32,36		
Log MG 28	1,64	1,25	0,67	0,00	1,51	Clase 2	Clase 2
Paciente 29	109,57	20,90	12,49	13,41	40,45		
	65,84	27,22	18,50	13,26	30,69		
Media P 29	84,94	23,85	15,20	13,33	35,23		
Log MG 29	1,93	1,38	1,18	1,12	1,55		
Paciente 30	135,99	38,95	14,81	1,00	28,07	8,06	8,52
	64,87	20,01	13,17	1,00	44,59		
Media P 30	93,92	27,92	13,97	1,00	35,38		
Log MG 30	1,97	1,45	1,15	0,00	1,55	Clase 3	Clase 3
Paciente 31	65,26	27,37	9,56	1,00	26,25	1,64	0,56
	49,38	21,94	5,35	1,00	23,10		
Media P 31	56,77	24,51	7,15	1,00	24,62		
Log MG 31	1,75	1,39	0,85	0,00	1,39	2,00	1,00
Paciente 32	78,33	23,89	9,68	1,00	36,45	6,33	7,40
	72,46	31,92	10,36	1,00	42,40		
Media P 32	75,34	27,61	10,01	1,00	39,31		
Log MG 32	1,88	1,44	1,00	0,00	1,59	Clase 3	Clase 3
Paciente 33	95,20	59,92	16,68	1,00	23,93	0,58	0,33
	71,90	29,44	21,35	1,00	28,81		
Media P 33	82,73	42,00	18,87	1,00	26,26		
Log MG 33	1,92	1,62	1,28	0,00	1,42	1,00	0,00
Paciente 34	132,59	53,36	24,85	1,00	51,61		
	44,55	87,59	33,36	16,85	4,97		
Media P 34	76,86	68,37	28,79	4,10	16,02		
Log MG 34	1,89	1,83	1,46	0,61	1,20		
Paciente 35	173,16	58,28	25,30	2,84	46,21	3,81	7,23
	43,26	85,02	51,10	18,96	6,35		
Media P 35	86,55	70,39	35,96	7,34	17,13		
Log MG 35	1,94	1,85	1,56	0,87	1,23	Clase 3	Clase 3

Tabla 11. Valores de áreas de pápula e Ig E específica *Ulocladium botrytis*

Estandarización *Ulocladium chartarum*

Concentración	10	1	0.1	0.01	H _{int}	Criterios	Log HEP/paciente	HEP/paciente ordenado	Límite de confianza	Concentración	Ecuación de la recta	Pendiente	Coefficiente de correlación
Log con	1.000	0.000	-1.000	-2.000									
Log MG 1	1.64	1.09	0.94	-0.11	1.25	A	0.10	1.26		Log MG 1	$0.541x + 1.1605$	0.541	0.9096
Log MG 2	1.29	0.86	0.47	0.00	1.20	A	0.77	5.93		Log MG 2	$0.425x + 0.8666$	0.425	0.9088
Log MG 3	1.80	1.56	1.34	1.14	1.43	A	-0.63	0.23		Log MG 3	$0.210x + 1.5685$	0.219	0.9098
Log MG 4	1.61	1.00	0.79	0.25	1.02	A	-0.26	0.55		Log MG 4	$0.430x + 1.1277$	0.430	0.9704
Log MG 5	1.71	1.44	1.11	0.65	1.38	A	-0.06	0.87	0.05	Log MG 5	$0.340x + 1.4031$	0.349	0.9845
Log MG 6	1.97	1.70	1.08	0.70	1.63	A	0.10	1.25	0.23	Log MG 6	$0.442x + 1.5813$	0.442	0.9799
Log MG 7	1.74	1.44	0.95	0.86	1.34	A	-0.20	0.63	0.55	Log MG 7	$0.312x + 1.4$	0.312	0.9444
Log MG 8	1.53	1.34	0.97	0.77	1.58	NA	1.10	12.52	0.63	Log MG 8	$0.265x + 1.2861$	0.265	0.9853
Log MG 9	1.73	1.39	1.13	0.00	1.51	A	0.22	1.68	0.69	Log MG 9	$0.546x + 1.3369$	0.546	0.8812
Log MG 10	2.10	1.75	1.25	0.48	1.58	A	-0.16	0.69	0.74	Log MG 10	$0.538x + 1.662$	0.538	0.9706
Log MG 11	1.65	1.39	1.24	0.56	1.38	A	-0.05	0.88	0.87	Log MG 11	$0.343x + 1.3797$	0.343	0.8992
Log MG 12	1.55	1.31	1.19	0.00	1.43	NA	0.20	1.59	0.88	Log MG 12	$0.476x + 1.2487$	0.476	0.7926
Log MG 13	1.69	1.55	1.28	0.63	1.52	NA	0.11	1.28	0.88	Log MG 13	$0.346x + 1.4601$	0.346	0.8978
Log MG 14	1.79	1.35	1.19	0.97	1.64	A	0.65	4.49	1.91	Log MG 14	$0.262x + 1.4554$	0.262	0.9526
Log MG 15	1.73	1.45	1.00	0.59	1.42	A	0.08	1.19	1.19	Log MG 15	$0.386x + 1.8588$	0.386	0.9917
Log MG 16	1.70	1.37	1.18	0.67	1.59	A	0.55	3.57	1.20	Log MG 16	$0.329x + 1.3944$	0.329	0.9635
Log MG 17	1.50	1.24	1.04	0.00	1.40	A	0.32	2.08	1.25	Log MG 17	$0.470x + 1.1811$	0.470	0.8515
Log MG 18	1.99	1.68	1.22	0.99	1.65	A	0.00	1.01	1.26	Log MG 18	$0.346x + 1.6429$	0.346	0.9861
Log MG 19	1.61	1.34	0.61	0.00	1.39	A	0.39	2.44	1.28	Log MG 19	$0.554x + 1.1652$	0.554	0.9715
Log MG 20	1.72	1.39	1.10	0.00	1.64	A	0.45	2.84	1.21	Log MG 20	$0.545x + 1.3259$	0.545	0.8881
Log MG 21	1.65	1.48	1.21	0.42	1.35	A	-0.13	0.74	1.40	Log MG 21	$0.394x + 1.3859$	0.394	0.8791
Log MG 22	1.86	1.64	1.34	0.49	1.57	NA	-0.03	0.94	1.68	Log MG 22	$0.440x + 1.5543$	0.440	0.8959
Log MG 23	1.77	1.31	0.93	0.92	1.41	NA	0.03	1.07	2.02	Log MG 23	$0.193x + 1.2537$	0.291	0.8013
Log MG 24	1.59	1.40	0.92	0.00	1.24	A	-0.05	0.88	2.08	Log MG 24	$0.525x + 1.241$	0.526	0.9124
Log MG 25	1.81	1.39	1.25	0.00	1.49	A	0.08	1.20	2.44	Log MG 25	$0.556x + 1.879$	0.556	0.8534
Log MG 26	1.82	1.53	0.86	0.41	1.46	A	0.12	1.31	2.84	Log MG 26	$0.490x + 1.4011$	0.490	0.9794
Log MG 27	1.59	1.36	0.95	0.44	1.34	A	0.15	1.40	3.57	Log MG 27	$0.386x + 1.2782$	0.386	0.9751
Log MG 28	1.64	1.25	0.67	0.00	1.51	A	0.61	4.12	4.12	Log MG 28	$0.549x + 1.639$	0.549	0.9864
Log MG 29	1.93	1.38	1.18	1.12	1.55	NA	-0.04	0.92	4.49	Log MG 29	$0.261x + 1.5338$	0.261	0.8426
Log MG 30	1.97	1.45	1.15	0.00	1.55	A	0.11	1.28	5.93	Log MG 30	$0.622x + 1.4519$	0.622	0.9268
Log MG 31	1.75	1.39	0.85	0.00	1.39	NA	0.15	1.42		Log MG 31	$0.580x + 1.2893$	0.580	0.9649
Log MG 32	1.88	1.44	1.00	0.00	1.59	A	0.31	2.02		Log MG 32	$0.607x + 1.8833$	0.607	0.9509
Log MG 33	1.92	1.62	1.28	0.00	1.42	NA	-0.19	0.64		Log MG 33	$0.610x + 1.5992$	0.610	0.8696
Log MG 34	1.89	1.83	1.46	0.61	1.20	NA	-0.99	0.10		Log MG 34	$0.410x + 1.6379$	0.419	0.8467
Log MG 35	1.94	1.85	1.56	0.87	1.23		-1.29	0.05		Log MG 35	$0.351x + 1.7269$	0.351	0.8698

A Admitido
NA No Admitido

HEP población 1.25 mg/mL *Ulocladium chartarum*

El 95% de la población estará entre los HEP del paciente 8 al 19

Todos las pendientes de los pacientes incluidos son ≥ 0.1

Todos los coeficientes de correlación son ≥ 0.85

Tabla 12. Cálculo del valor HEP de *Ulocladium botrytis*

6. PERFILES ALERGÉNICOS DE LOS EXTRACTOS DE HONGOS:

A continuación, decidimos analizar la capacidad fijadora de IgE específica de las distintas bandas del antigenograma realizado en el punto 3 de este apartado de resultados. Para ello, se incubaron los sueros de los 26 pacientes seleccionados de forma individual y con elevado título de IgE específica frente a *Ulocladium botrytis*. El resultado tras aplicar la técnica de inmunotransferencia puede observarse en la figura 28

El alergograma así obtenido muestra la capacidad fijadora de Ig E de los distintos pacientes sobre el perfil del extracto.

En las distintas calles se observa una pronunciada capacidad fijadora de IgE específica en el entorno de los 15-29 kDa

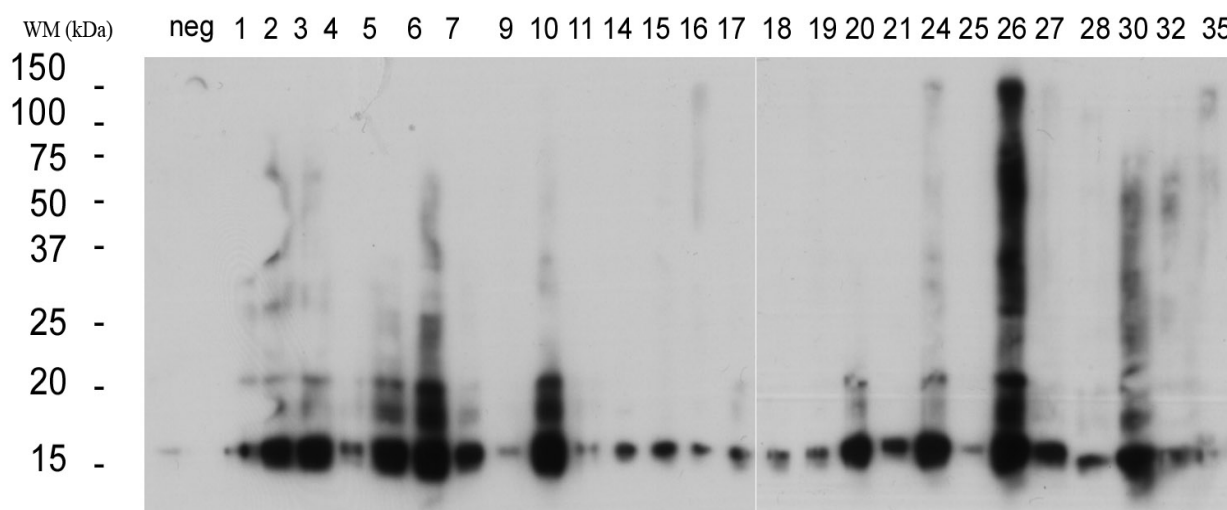


Figura 28: Inmunotransferencia (immunoblotting) del extracto alergénico de *Ulocladium botrytis*.

El siguiente paso fue estudiar la posible reactividad cruzada. Para ello, mediante técnica de DOTblot, se acoplaron en filas y columnas, y por duplicado, el panel de hongos seleccionados a los que enfrentamos la mezcla de sueros de los 26 pacientes incluidos en el estudio y el control negativo. Los resultados se muestran a continuación, pudiendo observarse la posible presencia de reactividad cruzada de los diferentes extractos alergénicos en condiciones nativas, frente a la mezcla de los sueros de los pacientes sensibilizados.

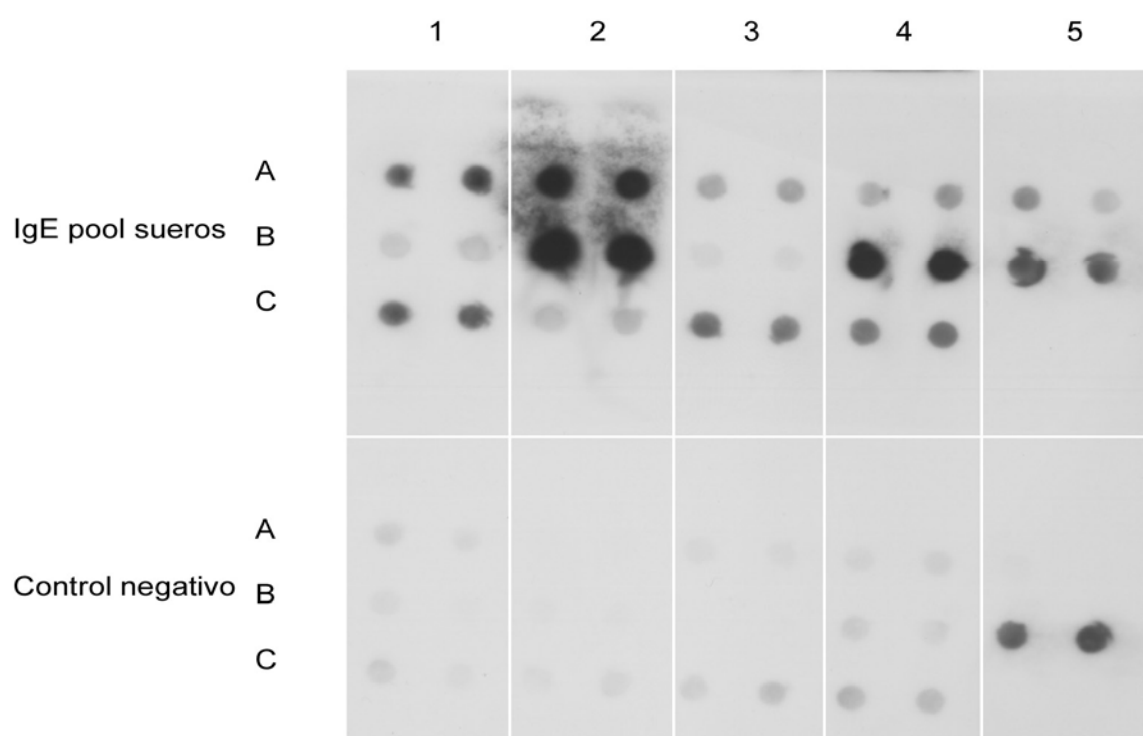


Figura 29: DOT blot realizado con los extractos seleccionados vs pool de sueros de pacientes y vs control negativo. La disposición de las calles es la siguiente;

Fila A: *Candida* (A1) , *Ulocladium* (A2) , *Mucor* (A3) , *Fusarium* (A4) , *Trichophyton* (A5)

Fila B: *Aspergillus niger* (B1), *Alternaria* (B2) , *Stachybotrys* (B3) , *Stemphylium* (B4), *Rhizopus* (B5)

Fila C: *Aspergillus fumigatus* (C1) , *Botrytis* (C2) , *Cladosporium* (C3) , *Penicillium* (C4)

Con objeto de determinar si se trata de un fenómeno de reactividad cruzada o polisensibilización, se procedió a tratar de identificar de forma cualitativa el alérgeno causal de la misma. Para ello, acudimos a la técnica de inmunotransferencia estudiando la capacidad fijadora de IgE del panel de hongos seleccionados. Como puede observarse en la figura siguiente se muestra el alergograma de los diferentes extractos alérgénicos de hongos seleccionados, en condiciones desnaturalizantes, reductoras y no reductoras, revelados con la mezcla de los sueros de los pacientes seleccionados en la estandarización de *Ulocladium botrytis* y con elevado título de IgE específica con el objetivo de estudiar la capacidad fijadora de IgE de los mismos. El uso de un control negativo (tampón de bloqueo en ausencia de suero) no reveló capacidad fijadora en ninguna de las calles

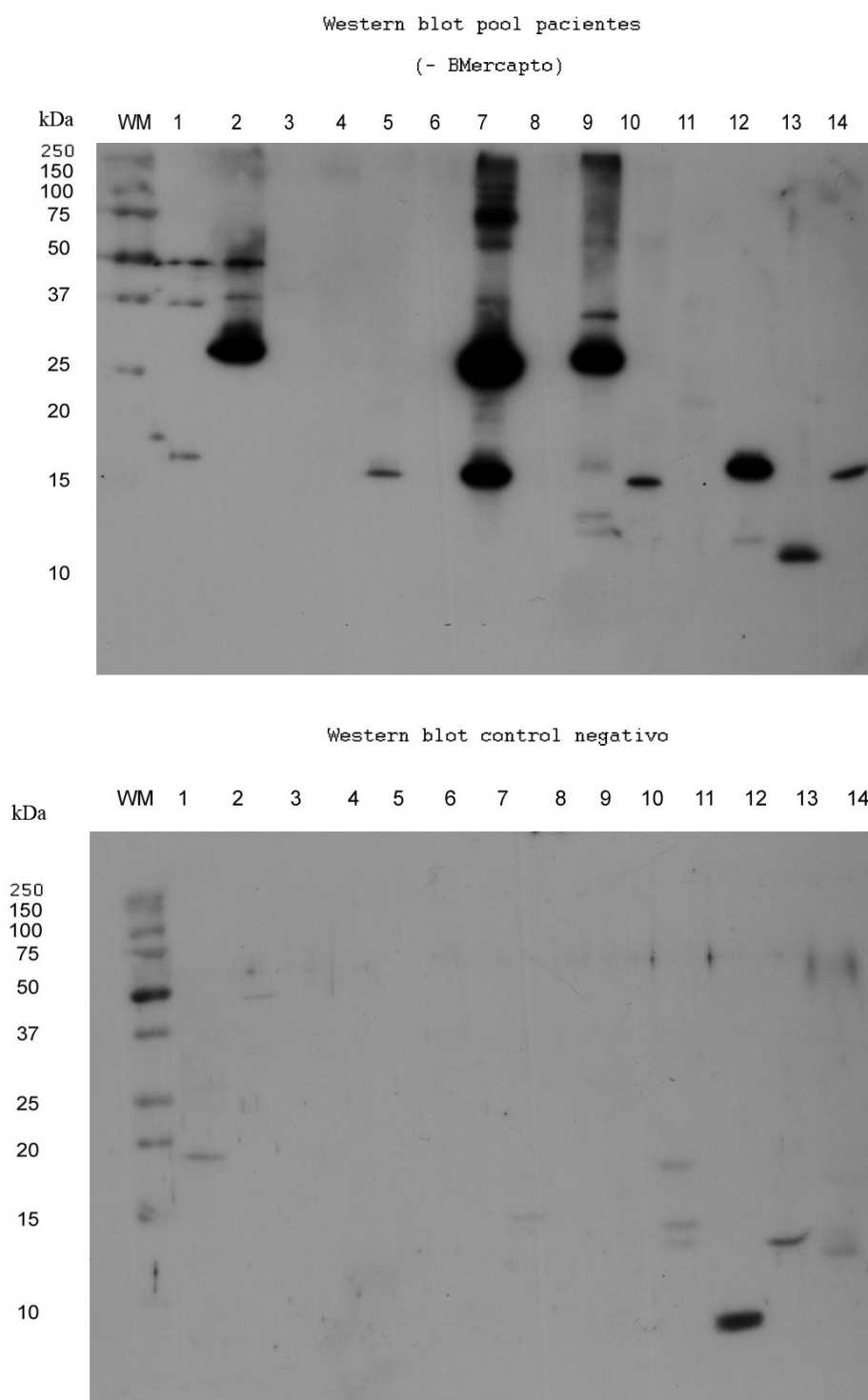


Figura 30: alergograma de extractos alergénicos de hongos en condiciones reductoras vs pool de pacientes seleccionados y vs control negativo. Calle 1: *Candida albicans*; Calle 2: *Ulocladium botrytis*; Calle 3: *Mucor mucedo*, Calle 4: *Fusarium sp.*; Calle 5: *Trichophyton rubrum*; Calle 6: *Aspergillus niger*; Calle 7: *Alternaria alternata*; Calle 8: *Stachybotrys chartarum*; Calle 9: *Stemphylium botryosum*; Calle 10: *Penicillium notatum*; Calle 11: *Rhizopus sp.*; Calle 12: *Aspergillus fumigatus*; Calle 13: *Botrytis sp.*; Calle 14: *Cladosporium herbarum*.

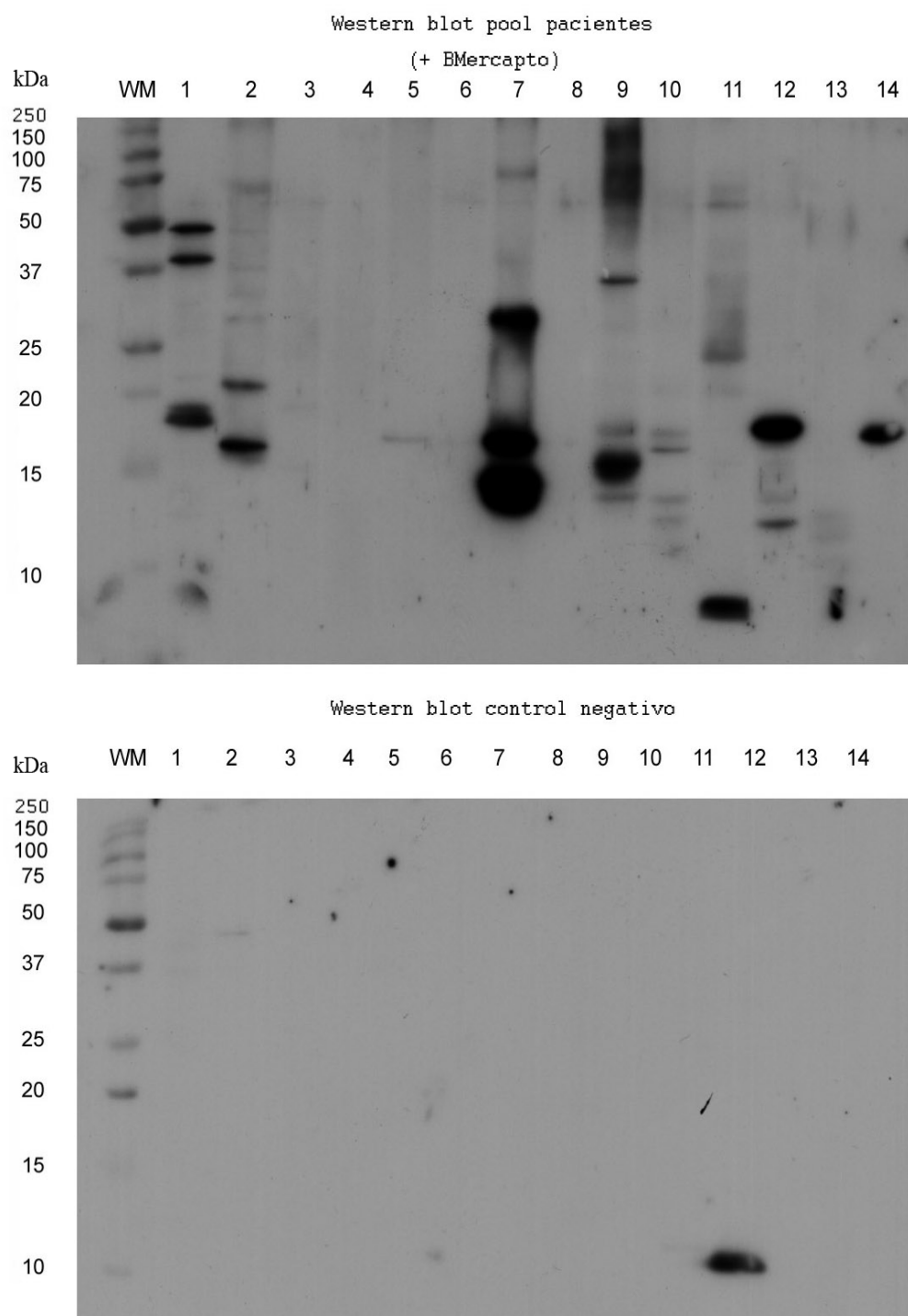


Figura 31: alergograma de extractos alergénicos de hongos en condiciones no reductoras vs pool de pacientes seleccionados y vs control negativo. Calle 1: *Candida albicans*; Calle 2: *Ulocladium botrytis*; Calle 3: *Mucor mucedo*, Calle 4: *Fusarium* sp.; Calle 5: *Trichophyton rubrum*; Calle 6: *Aspergillus niger*; Calle 7: *Alternaria alternata*; Calle 8: *Stachybotrys chartarum*; Calle 9: *Stemphylium botryosum*; Calle 10: *Penicillium notatum*; Calle 11: *Rhizopus* sp.; Calle 12: *Aspergillus fumigatus*; Calle 13: *Botrytis* sp.; Calle 14: *Cladosporium herbarum*.

La mezcla de sueros empleada fue la correspondiente a los pacientes seleccionados en la estandarización y de elevada clase de IgE específica frente a *Ulocladium botrytis*, muestra capacidad fijadora de sus Ig E específicas frente a un alérgeno con una masa molecular cercana a los 15 kDa en condiciones reductoras y 29 kDa en condiciones no reductoras, presente en los extractos de hongos de *Ulocladium*, *Alternaria* y *Stemphylium*

Con el fin de discriminar si es una reactividad cruzada o una polisensibilización acudimos a los estudios siguientes.

7. REACTIVIDAD CRUZADA

El valor Ag_{50} es un parámetro que también se emplea habitualmente para establecer la capacidad fijadora de IgE de un extracto alergénico mediante técnica de ELISA inhibición y forma parte de la documentación analítica de un extracto alergénico, así como de ensayos de reactividad cruzada. Los valores de Ag_{50} de los hongos que mostraron reactividad cruzada fueron establecidos inhibiendo el extracto homólogo y los heterólogos con la mezcla de los sueros de los pacientes, y sin inhibir para tener referencia del 100% de unión o el 0% de inhibición, tal y como muestra la figura 32. Sobre estas bases, determinamos el valor Ag_{50} del extracto de *Ulocladium botrytis*, que se estableció en 6.029 $\mu\text{g/mL}$.

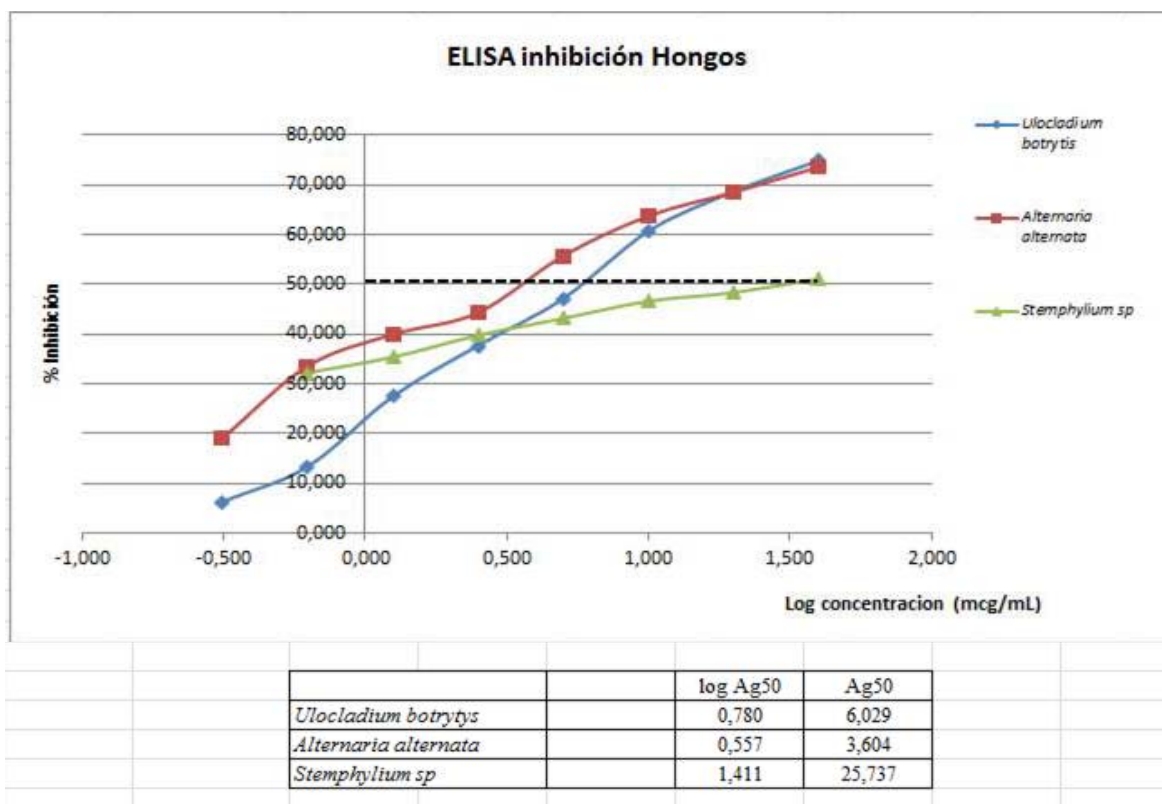


Figura 32: ELISA inhibición del extracto de *Ulocladium botrytis* versus *Ulocladium*, *Alternaria alternata* y *Stemphylium botryosum*

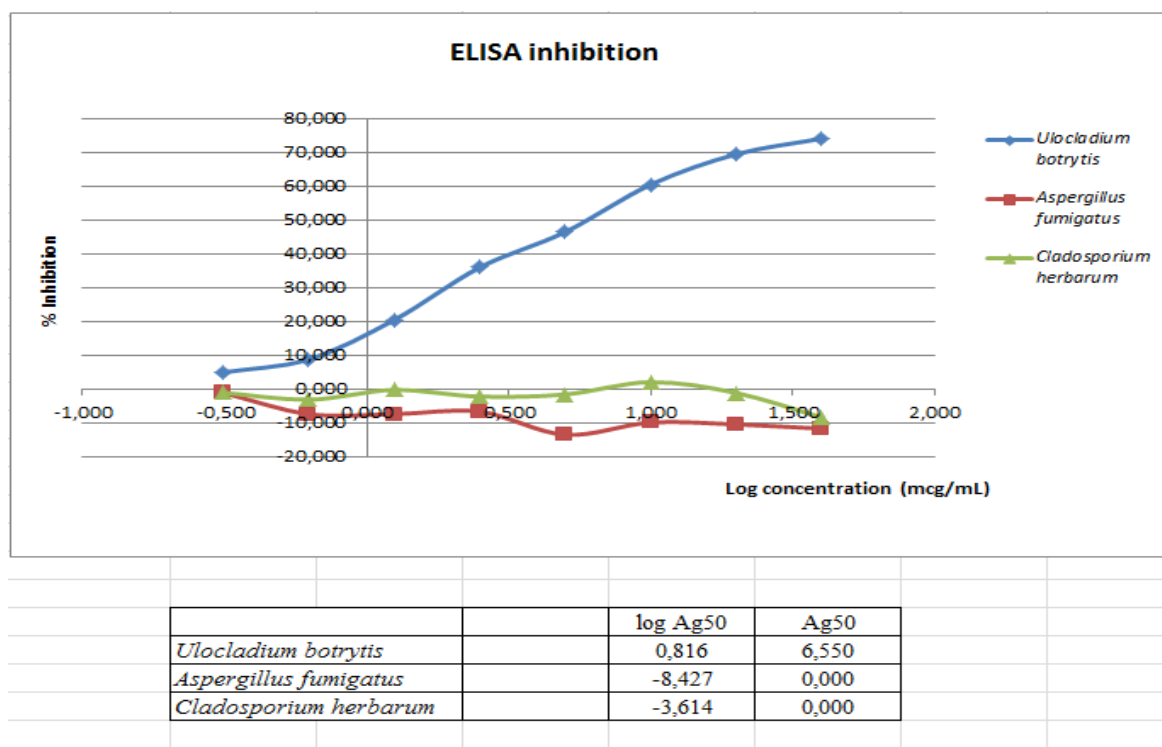


Figura 33: ELISA inhibición del extracto de *Ulocladium botrytis* versus *Ulocladium botrytis*, *Aspergillus fumigatus* y *Cladosporium herbarum*

Como puede observarse, la mezcla de los sueros de elevada clase de Ig E específica obtenidos de los pacientes seleccionados para *Ulocladium botrytis*, mantienen su capacidad fijadora para el extracto homólogo y también para los extractos de *Alternaria alternata* y *Stemphylium botryosum*, lo que revela una elevada reactividad cruzada o polisensibilización a estos dos últimos extractos, mayor en el caso del extracto de *Alternaria alternata*.

Por el contrario, como se desprende de la figura 33, los extractos de *Aspergillus* y *Cladosporium* carecen de la fijación de IgE específica y de esta manera se descarta la posible reactividad cruzada o polisensibilización

Teniendo en cuenta que el alérgeno Alt a1 es el mas importante de los alérgenos descritos en esta especie, el siguiente paso fue estudiar la capacidad inhibitoria del alérgeno Alt a 1 sobre la Ig E específica de la mezcla de sueros de los pacientes del estudio y frente a los extractos alergenicos de las especies de hongos seleccionados (*Candida albicans*, *Ulocladium botrytis*, *Alternaria alternata*, *Stemphylium botryosum*, *Penicilium notatum*, *Aspergillus fumigatus* y *Cladosporium herbarum*), lo cual se puso de manifiesto mediante la técnica de inhibición de la inmunotransferencia tal y como se muestra en la siguiente figura. Debe de considerarse, que el alérgeno Alt a 1 tiene un peso molecular de 29 kDa en condiciones no reductoras y de 15 kDa en condiciones reductoras. De éste modo se puede observar como dicho alérgeno Alt a 1, inhibe a su homólogo en el extracto alérgénico de *Alternaria alternata* y a los

alérgenos de pesos moleculares similares en los extractos de *Ulocladium botrytis* y *Stemphylium botryosum*.

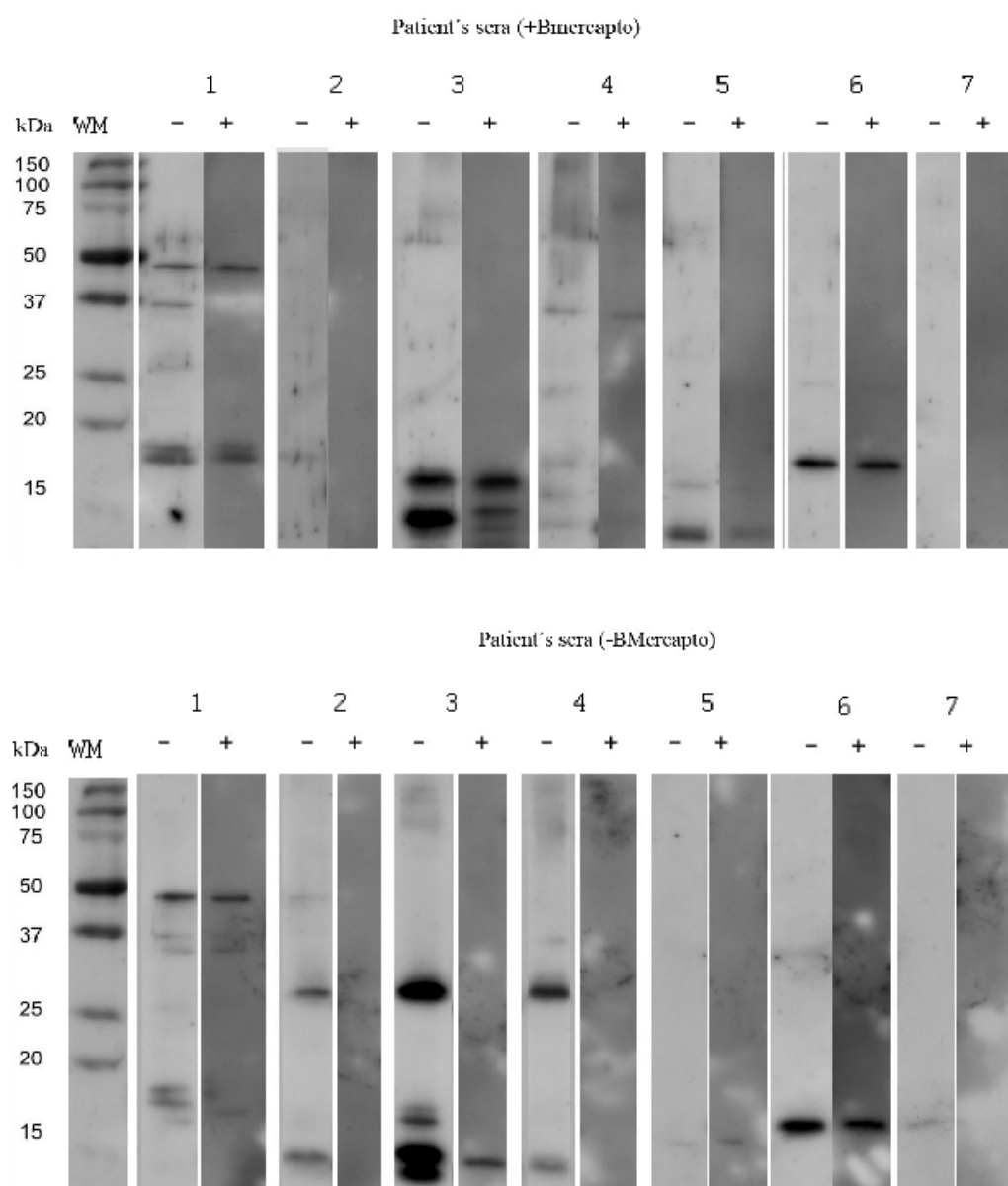


Figura 34 Inhibición de la Inmunotransferencia con el “pool” de sueros de los pacientes seleccionados en condiciones reductoras y no reductoras:

(-) Sin inhibir con Alt a 1

(+) Inhibido con Alt a 1

Calle 1: *Candida albicans*, calle 2: *Ulocladium botrytis*, calle 3: *Alternaria alternata*, calle 4: *Stemphylium botryosum*, calle 5: *Penicillium notatum*, calle 6: *Aspergillus fumigatus*, calle 7: *Cladosporium herbarum*

8. LIBERACIÓN DE HISTAMINA:

La técnica de liberación de histamina es una técnica funcional “ex vivo”, que permite valorar la liberación de este mediador por los basófilos al enfrentarse a los extractos alergénicos.

Los valores de liberación de histamina una vez que los basófilos de los pacientes seleccionados han sido estimulados con extracto de *Ulocladium botrytis* y Alt a 1 se muestran por separado en la siguiente tabla.

Paciente	Concentración [mcg/mL de Ulo/Alt]	Hist. Uloclad	Hist. Alt a 1	Paciente	Concentración [mcg/mL de Ulo/Alt]	Hist. Uloclad	Hist. Alt a 1	Paciente	Concentración [mcg/mL de Ulo/Alt]	Hist. Uloclad	Hist. Alt a 1
Paciente 1 (JMG)	[100/20]			Paciente 11 (LTCR)	[100/20]		20 ng/mL	Paciente 24 (RMP)	[100/20]		55 ng/mL
	[25/5]				[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]				[6.25/1.25]	41 ng/mL	
	[1.56/0.3125]	38 ng/mL	52 ng/mL		[1.56/0.3125]	23 ng/mL			[1.56/0.3125]		
	Clase	3	3		Clase	3	1		Clase	2	1
Paciente 2 (MMD)	[100/20]			Paciente 14 (JGA)	[100/20]			Paciente 25 (DFS)	[100/20]		
	[25/5]				[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]	29 ng/mL	25 ng/mL		[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	40 ng/mL	18 ng/mL		[1.56/0.3125]		
	Clase	2	2		Clase	3	2		Clase	NP	NP
Paciente 3 (AML)	[100/20]			Paciente 15 (ACT)	[100/20]			Paciente 26 (PAS)	[100/20]		
	[25/5]				[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]		25 ng/mL		[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]	37 ng/mL			[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	118 ng/mL	79 ng/mL
	Clase	2	2		Clase	0	0		Clase	3	3
Paciente 4 (LML)	[100/20]	24 ng/mL	30 ng/mL	Paciente 16 (ILG)	[100/20]			Paciente 27 (EAY)	[100/20]		
	[25/5]				[25/5]		88 ng/mL		[25/5]		
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]	36 ng/mL			[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	78 ng/mL	37 ng/mL
	Clase	1	1		Clase	2	2		Clase	3	3
Paciente 5 (ALF)	[100/20]	Clase 3	Clase 3	Paciente 17 (IMG)	[100/20]			Paciente 28 (MGS)	[100/20]		
	[25/5]				[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]	138 ng/mL	91 ng/mL		[1.56/0.3125]	49 ng/mL	18 ng/mL		[1.56/0.3125]	98 ng/mL	115 ng/mL
	Clase	3	3		Clase	3	2		Clase	3	3
Paciente 6 (JCA)	[100/20]			Paciente 18 (APP)	[100/20]			Paciente 30 (SGB)	[100/20]		
	[25/5]		157 ng/mL		[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]	35 ng/mL			[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	112 ng/mL	38 ng/mL
	Clase	3	2		Clase	0	0		Clase	3	3
Paciente 7 (NGR)	[100/20]			Paciente 19 (JASL)	[100/20]			Paciente 32 (AKS)	[100/20]		
	[25/5]	25 ng/mL	28 ng/mL		[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	38 ng/mL	133 ng/mL
	Clase	2	2		Clase	0	0		Clase	3	3
Paciente 9 (LCF)	[100/20]			Paciente 20 (MSD)	[100/20]			Paciente 35 (ECT)	[100/20]		
	[25/5]		122 ng/mL		[25/5]				[25/5]		
	[6.25/1.25]	31 ng/mL			[6.25/1.25]				[6.25/1.25]		
	[1.56/0.3125]				[1.56/0.3125]	46 ng/mL			[1.56/0.3125]	177 ng/mL	151 ng/mL
	Clase	2	2		Clase	3	0		Clase	3	3
Paciente 10 (SDF4)	[100/20]			Paciente 21 (ERF)	[100/20]						
	[25/5]				[25/5]						
	[6.25/1.25]				[6.25/1.25]	42 ng/mL					
	[1.56/0.3125]	115 ng/mL	43 ng/mL		[1.56/0.3125]		24 ng/mL				
	Clase	3	3		Clase	2	3				

35. Determinación de la liberación de histamina de los extractos de *Ulocladium botrytis* y Alt a 1

La interpretación de los resultados y su valoración se realizó en base a los valores indicados por el fabricante (Reflab). Todos los pacientes mostraron valores de liberación de histamina que se correlacionaban claramente con los resultados positivos de las pruebas cutáneas y de la IgE específica, sin embargo llama la atención los resultados obtenidos en los pacientes 15, 18 y 19. Contrastamos que en el paciente 19 su hemograma, en el momento de la extracción, mostró una significativa basopenia (0,4% y <100), lo cual explica la negatividad de los resultados obtenidos en la técnica de liberación de histamina. Este hecho no pudo ser contrastado en los pacientes 15 y 18 pero consideramos de interés declararlo, pues conforma un hallazgo no descrito hasta la actualidad y que debe de ser tenido en cuenta a la hora de la exclusión o no en la aplicación de esta técnica

9. CUANTIFICACION Alt a 1

El siguiente objetivo fue cuantificar la presencia de Alt a1 en los extractos alergénicos. Para ello acudimos a la técnica de ELISA directo sobre los extractos de *Alternaria alternata*, *Ulocladium botrytis*, *Stemphylium botryosum*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium herbarum* y *Penicilium notatum*, cuyos resultados se muestran en la siguiente figura:

<i>Especie</i>	<i>[Alt a 1] ng. mg⁻¹ extracto</i>
<i>Alternaria alternata</i>	299
<i>Ulocladium botrytis</i>	151
<i>Stemphylium botryosum</i>	ND
<i>Stachybotrys chartarum</i>	ND
<i>Cladosporium herbarum</i>	ND
<i>Penicilium notatum</i>	ND

ND, no detectable (< 0,8 ng/mL)

Figura 36. ELISA cuantificación de Alt a 1 del extracto de *Alternaria alternata*, *Ulocladium botrytis*, *Stemphylium botryosum*, *Stachybotrys chartarum*, *Cladosporium herbarum* y *Penicilium notatum*

10. DETECCION ALÉRGENOS ORTÓLOGOS

Un alérgeno ortólogo se define como aquel alérgeno que no puede considerarse como alérgeno especie específico y que por tanto se muestra en diferentes miembros de familias taxonómicas.

Con el fin de analizar la presencia de Alt a 1 en el extracto alergénico de *Ulocladium botrytis*, se realizó una electroforesis en 2D en condiciones desnaturalizantes reductoras, tal y como muestra la figura 37. En la figura

se revela la presencia de una proteína de aproximadamente 15 kDa y pI en torno a 4,5, compatible con el descrito alérgeno ortólogo del Alt a 1 en el extracto de *Ulocladium botrytis*, el propuesto Ulo b 1

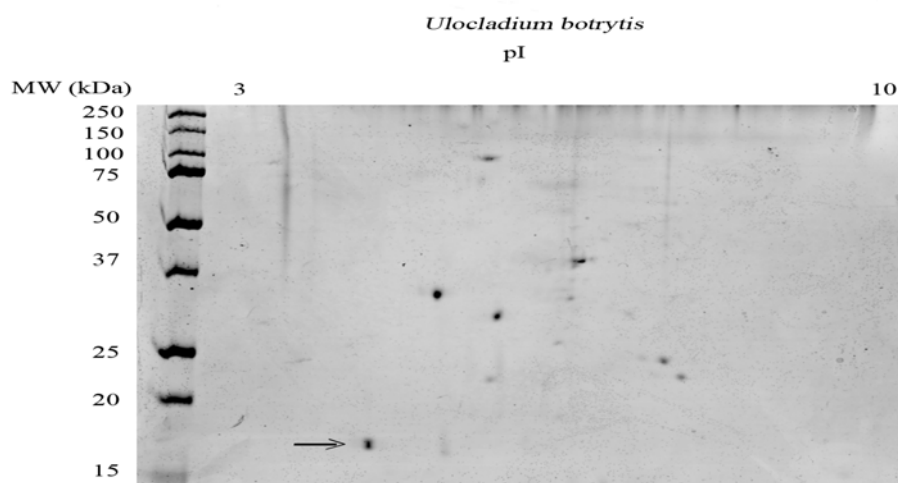


Figura 37 Electroforesis en 2D del extracto de *Ulocladium botrytis*

A continuación nos planteamos comprobar la capacidad fijadora de varias de las proteínas presentes en el extracto estandarizado de *Ulocladium botrytis*, especialmente la considerada compatible en peso molecular con el alérgeno Alt a 1, y para ello empleamos la técnica de inmunotransferencia en 2D con los sueros de los pacientes que cumplieron criterios, tal y como muestra la figura.

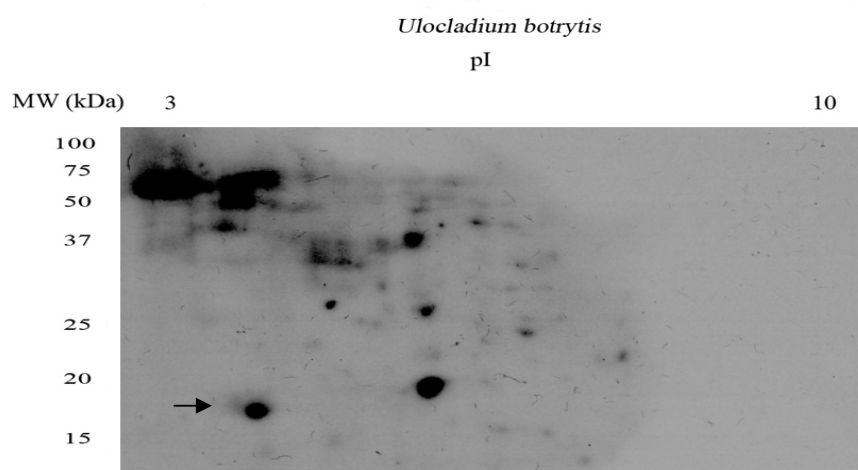


Figura 38. Inmunotransferencia en 2D del extracto de *Ulocladium botrytis*

La proteína reconocida por el pool de sueros de los pacientes que cumplieron criterios se extrajo del gel de SDS PAGE y con el fin de identificarla, acudimos a técnicas de proteómica, como es la definición de su huella peptídica. Esta se realizó determinando su secuencia de aminoácidos mediante digestión y fragmentación para su posterior separación (espectrometría de masas) y comparación con secuencias ya descritas en bases de datos

La secuencia de aminoácidos se describe a continuación (en rojo, puede observarse la similitud en las secuencias con el alérgeno ortólogo Alt a 1).

```

1 MQFTTIASLF AAAGLAAAAP LESRQDNASC PVTTKGDYVW KISEFYGRKP
51 EGTYYNSLGF NIKATNGGTL DFTCSAQADK LEDHKWYSCG ENSFMDFSFD
101 SDRSGLLLKQ KVSDE

```

La secuencia de Alt a 1 es:

```

10      20      30      40      50      60
LAAAAPLESR QDTASCPVTT EGDYVWKISE FYGRKPEGTY YNSLGFNIKA TNGGTLDFTC
70      80      90      100     110     120
SHSADKLEDH TWYSCGENSF MDFSFDSDRN GLLLLKQKVS DITYVATATL PNYCRAGGNG
130
PKDFVCQGVA DAYITLV

```

<http://www.uniprot.org/uniprot/A6N2F3>

En la tabla y la figura siguientes se resumen los datos más relevantes en referencia a la mencionada identificación:

Proteína identificada	Secuencia reconocida	Sequence coverage	Masa nominal (Mr)	pI calculado	Número acceso NCBI
Alt a 1	GDYVWKISEFYGRKP EGTYYNSLGFNIK	24%	12.810	4.90	gi 21913174

Tabla 13. Resultados de la huella peptídica para la proteína con capacidad fijadora de *Ulocladium botrytis* (alérgeno ortólogo de Alt a1)

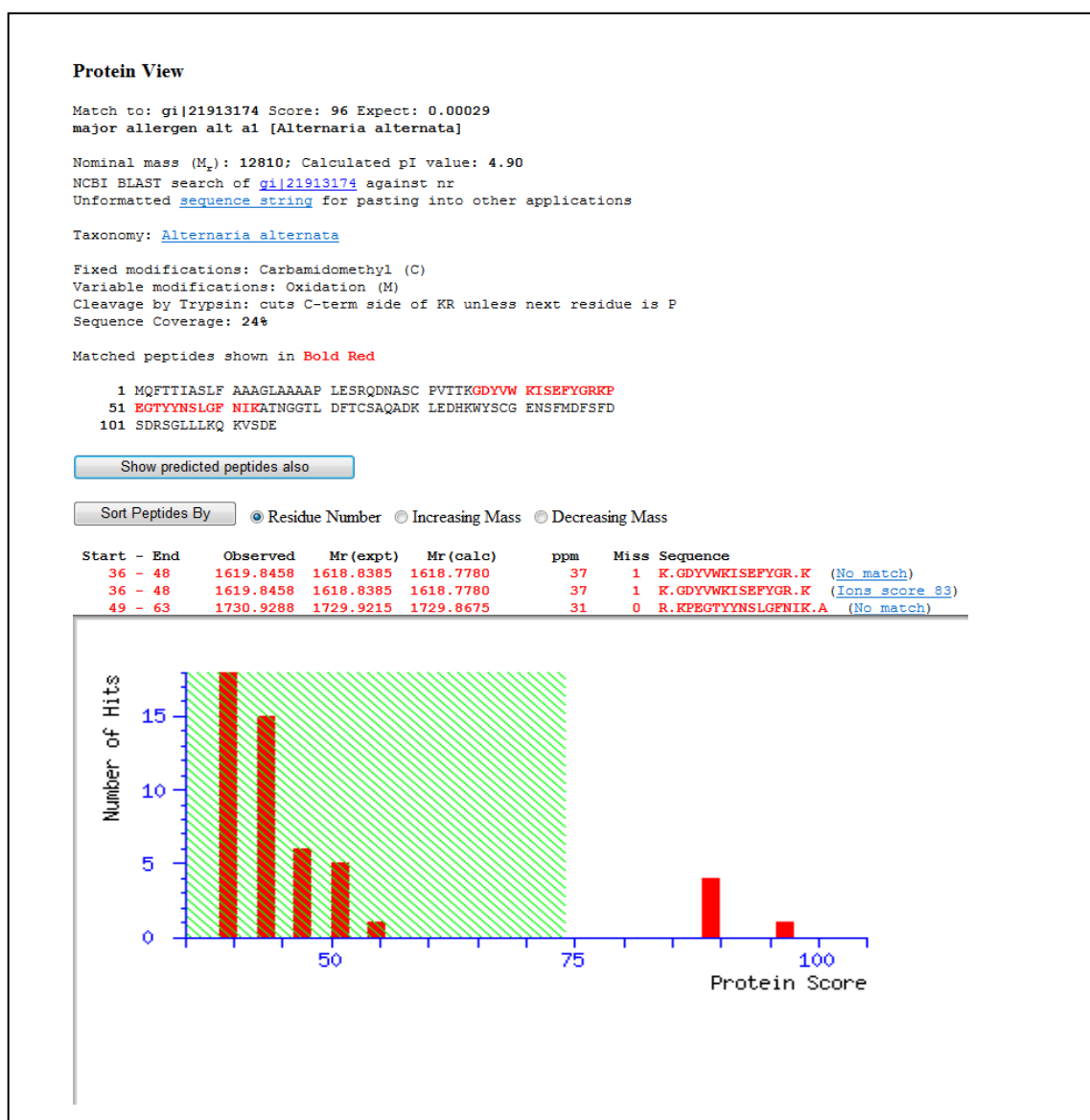


Figura 39. Descripción de la proteína identificada (fuente Mascot: <http://www.matrixscience.com/>)

```

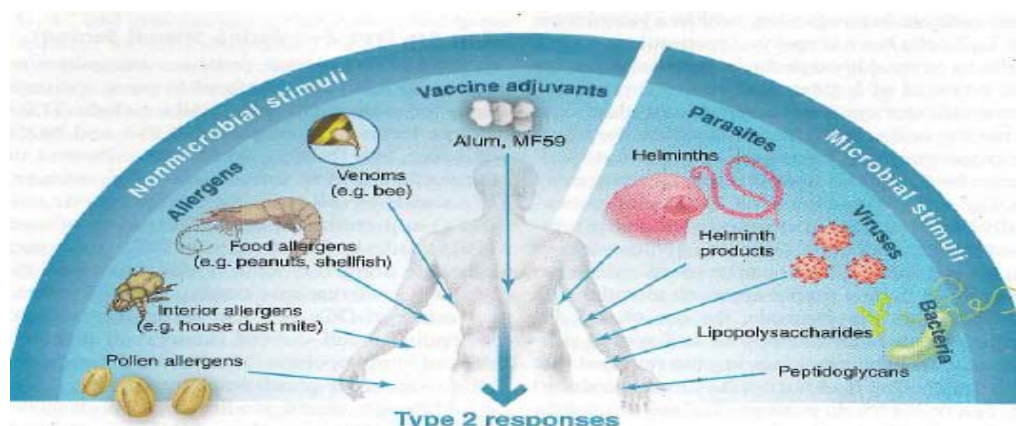
U. botrytis 15 LAAAPLESRQDNASCPVTTKGDYVWKISEFYGRKPEEGTYNSLGFNIKATNGGTLDFTC 74
Alta 1 .....T.....E..... 60

U. botrytis 75 SAQADKLEDHKWYSCGENSFMDFSFSDRSGLLLKQKVSDE 115
Alta 1 61 .HS.....T.....N.....D 101

```

V. DISCUSSION

Actualmente existen más de 3 millardos de personas en el mundo que se encuentran infectadas por parásitos (helminths) o que sufren de patologías alérgicas en relación con el aparato respiratorio (asma y rinitis), la piel (dermatitis, urticaria, eccemas) y las diferentes expresiones de la sensibilidad a alimentos y medicamentos y que son consideradas como alteraciones de la respuesta inmunitaria T_H2 (Pulendran, 2012).



El diagnóstico de las mismas se basa fundamentalmente en una combinación de estudios de identificación etiológica que muestren la presencia de la fuente de sensibilización en el entorno del paciente y la posible causa-efecto, el historial clínico del paciente y pruebas diagnósticos “in vivo” e “in vitro” (Patterson, 1985). Para la realización de las pruebas diagnósticas es preciso contar con extractos alérgenos y los resultados que se obtienen van a depender de su calidad (Kurth, 1990). Los extractos alérgenos son pues herramientas indispensables en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas, así como en la investigación de los procesos implicados en éste fenómeno de condición inflamatoria (Bousquet, 1998).

En el caso específico de la alergia a hongos el problema se agrava dado el amplio número de especies, su variabilidad pleomórfica, las características somáticas y metabólicas de sus antígenos y la composición de los medios de cultivo, que conduce a mosaicos antigénicos diferentes y que se manifiesta en las diferentes composiciones cualitativas (antigenogramas y alergogramas) y cuantitativas, como es la potencia de los extractos alérgenos obtenidos incluso a partir de una misma cepa. El resultado es que el diagnóstico se complica, pues en muchos casos los estudios de correlación entre la presencia de la fuente de sensibilización y el posible diagnóstico etiológico que la implica no se produce, lo cual conlleva a que las pruebas diagnósticas no muestren la eficacia, en términos de sensibilidad y especificidad que se obtienen con otros alérgenos (D'Amato et al. 1997).

En este estudio se han producido extractos alérgenos de hongos, a partir de mezclas de micelios y esporas, tomando como base de su selección los estudios aerobiológicos y de incidencia de las especies más relevantes y alérgicamente referenciadas por las bases de datos de la IUIS y Allergome, incluyendo algunas especies emergentes como el caso del *Stachybotrys chartarum*, así como otras especies de hongos como es el caso de los Deuteromycetes las especies *Ulocladium botrytis*, *Botrytis* sp, *Stemphylium botryosum* y en el caso de Phycomycetes las especies *Mucor mucedo* y *Rhizopus*

sp y teniendo en cuenta en la selección de los mismos los principios de Tommem en referencia a la significatividad de la presencia de la fuente alérgica, es decir, ser un organismo activo, producirse en grandes cantidades y mantenerse en suspensión.

Las materias primas han considerado así mismo los requisitos exigibles a éste tipo de productos, conforme a las consideraciones de la Agencia Europea del Medicamento en su directriz actual sobre la producción y control de calidad de los extractos alérgicos (CHMP/BWP/304831/96. 2007). Las condiciones de homogeneización y de extracción de sus alérgenos condujeron a un rendimiento de la extracción hidrosoluble de alérgenos a partir de la mezcla micelio-espora de cada una de las especies, en términos de proteína en el entorno del 5 – 10% sobre la mezcla inicial de partida.

La estructura antigénica (antigenograma) y alérgica (alergograma) se evaluó mediante técnicas electroforéticas cualitativas (SDS PAGE e inmunotransferencia), así como semicuantitativas (ELISA y DOT blot), mostrando prácticamente un elevado nivel de bandas en un rango entre los 5 y los 100 kDa con capacidad fijadora de Ig E específica para cada una de las especies seleccionadas, aspecto éste de importancia en el diagnóstico etiológico y en el tratamiento con inmunoterapia alérgica específica (Valenta y Dietrich, 2002) y siempre comparadas en referencia a los alérgenos descritos en la Database de la IUIS y Allergome:

- *Alternaria alternata*: Alt a 1 (15.3-16.4 kD), Alt a 4 (57 kD), Alt a 5 (11 kD), Alt a 6 (45 kD), Alt a 7 (22 kD), Alt a 8 (29 kD), Alt a 10 (53 kD), Alt a 12 (11 kD), Alt a 13 (26 kD).
- *Aspergillus fumigatus*: Asp f 1 (18 kD), Asp f 2 (37 kD), Asp f 3 (19 kD), Asp f 4 (30 kD), Asp f 5 (40 kD), Asp f 6 (26.5 kD), Asp f 7 (12 kD), Asp f 8 (11 kD), Asp f 9 (34 kD), Asp f 10 (34 kD), Asp f 11 (24 kD), Asp f 12 (90 kD), Asp f 13 (34 kD), Asp f 15 (16 kD), Asp f 16 (43 kD), Asp f 18 (34 kD), Asp f 22 (46 kD), Asp f 23 (44 kD), Asp f 27 (18 kD), Asp f 28 (13 kD), Asp f 29 (13 kD), Asp f 34 (20 kD).
- *Aspergillus niger*: Asp n 14 (105 kD), Asp n 18 (34 kD), Asp 25 (66-100 kD).
- *Candida albicans*: Cand a 1 (40 kD).
- *Cladosporium herbarum*: Cla h 2 (45 kD), Cla h 5 (11 kD), Cla h 6 (46 kD), Cla h 7 (22 kD), Cla h 8 (28 kD), Cla h 10 (53 kD), Cla h 12 (11 kD).
- *Fusarium sp* (referenciado sobre *F. culmorum* en Database IUIS): Fus c 1 (11 kD), Fus c 2 (13 kD).
- *Penicillium sp* (referenciado sobre *P. chrysogenum* en Database IUIS): Pen ch 13 (34 kD), Pen ch 18 (32 kD), Pen ch 20 (68 kD), Pen ch 33 (16 kD), Pen ch 35 (36.5 kD).
- *Stachybotrys chartarum*: Sta c 3 (21 kD).
- *Trichophyton rubrum*: ND
- *Botrytis sp*: ND
- *Fusarium sp*: ND
- *Mucor mucedo*: ND
- *Ulocladium botrytis*: Ulo b 1

Además los resultados obtenidos de titulación serológica de Ig E específica de ambas especies de *Ulocladium* (*U. botrytis* y *U. chartarum*) se muestran prácticamente similares, lo que implica que las variaciones alérgicas a nivel de especie no parecen mostrar diferencias significativas a nivel de selección.

Ulocladium botrytis se identificó habitualmente en los domicilios de los pacientes con historia clínica y síntomas sugestivos de presentar cuadros de sensibilización fúngica. La incidencia de éste tipo de sensibilizaciones en nuestro entorno es elevada dadas las características climáticas y áreas de cultivo, fundamentalmente de cereal, que favorecen el crecimiento y dispersión de éste tipo de fuentes de sensibilización. Este hecho puede ser considerado casi como inédito, ya que no hemos encontrado descripciones al respecto de ésta especie como posible fuente de sensibilización primaria en la amplia revisión realizada por Vijay y Kurup (Vijay y Kurup. 2004). Tan sólo hemos encontrado descripciones de reactividades cruzadas entre éste hongo y otras especies de la Familia Pleorospiceae como *Curvularia* y *Stemphylium* atribuibles a la presencia del alérgeno mayor de la especie *Alternaria alternata* denominado Alt a 1 (Vijay 1999 y Horner 1995) y también en otras diferentes Familias más separadas filogenéticamente como *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* o *Cladosporium herbarum*, aunque en menor grado (Martínez et al 1994 y Horner 1995).

Sobre la base de ésta descripción se acometió la estandarización biológica del extracto de *Ulocladium botrytis*, estableciéndose los patrones analíticos, cualitativos y cuantitativos del mismo que permitan el correcto diagnóstico etiológico de ésta fuente de sensibilización. Las pruebas cutáneas mediante la técnica del Prick test, realizadas en 26 pacientes con el extracto de *Ulocladium botrytis* y considerando el protocolo preconizado en las Nordic Guidelines y la directriz de la EMA, aportan un resultado del valor HEP aplicable al mismo de 1.25 mg/mL y una potencia alérgica establecida por ELISA inhibición ó valor Ag₅₀ de 6.029 µg/mL, que define el IHR del extracto.

Experimentalmente y conforme a la directriz EMA aplicable a los extractos alérgicos, se estableció el estudio del comportamiento de la técnica de liberación de histamina sobre placas de microtiter tratadas con fibra de vidrio, a partir de basófilos aislados de sangre circulante. Esta técnica permite evaluar el comportamiento “ex vivo” del fenómeno de la hipersensibilidad con el mismo extracto alérgico que se emplea en la prueba cutánea, situación que no se produce cuando se acude a la técnica de detección de Ig E específica, en la que el extracto alérgico empleado en la prueba cutánea es diferente del empleado en la cuantificación “in vitro” de Ig E específica y que puede y en algunos casos ser clave a la hora de establecer el diagnóstico etiológico. La concordancia entre ésta técnica y la detección de Ig E alérgico específica se ha mostrado muy elevada y una de las limitaciones a considerar al respecto de su incorporación a la rutina, es la necesidad de considerar el hemograma del paciente y concretamente la concentración de basófilos, factor que se ha mostrado crítico en algunos pacientes con basopenia, aspecto éste a considerar también en el historial del paciente y su posible relación con el fenómeno de hipersensibilidad.

Otro de los apartados relevantes aportados en el estudio es la definición de existencia de reactividad cruzada de *Ulocladium botrytis* con otras especies de

hongos y el de la definición de sus posibles alérgenos clínicamente relevantes o mayores. Como es habitual con éste tipo de alérgenos, los pacientes presentan polisensibilización. En el caso de *Ulocladium botrytis*, pruebas cutáneas y detección de Ig E alérgeno específica presentaban respuestas positivas a *Alternaria alternata* y los alergogramas establecidos involucran al alérgeno mayor Alt a 1 como posible responsable de la polisensibilización.

El alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, reactivo en más del 90% de los pacientes sensibilizados a *Alternaria alternata*, cuando se ensaya en su forma nativa purificada y sobre las bases establecidas anteriormente, podría ser considerado como un alérgeno no especie específico y por consiguiente tratarse de un alérgeno ortólogo y por tanto representaría la expresión de un gen común. En cualquier caso quedaría demostrado en éste estudio, al menos para la especie *Ulocladium botrytis*, tal como muestra el resultado de concordancia aportado por la “huella peptídica” de Alt a 1 en ambas especies y posiblemente en otros hongos seleccionados como *Stemphylium* y proponer su inclusión en todas las bases de datos, tal como propone Allergome Ulo b 1. En el caso del *Stemphylium* y aun cuando los alergogramas muestran también patrones de fijación de Ig E a bandas de diferentes pesos moleculares de los que corresponderían al alérgeno Alt a 1 y por tanto no revelar su presencia, sin embargo debemos de considerar que su ausencia sea debida posiblemente a la elevada especificidad del anticuerpo comercial monoclonal rAlt a 1 empleado en la técnica de detección.

Otros aspectos inéditos que éste estudio ofrece es la ausencia de relevancia alergológica, al menos en nuestro entorno, de la especie emergente *Stachybotris chartarum* y el carácter perenne y no estacionario de la sensibilización a *Ulocladium botrytis*.

Finalmente considerar que *Ulocladium botrytis* debería de conformar parte de la batería diagnóstica en los ensayos de sensibilidad a hongos y considerarse como un representante homólogo de la Familia Pleorosporeaceae y que el empleo de un alérgeno mayor, que puede ser considerado como ortólogo, como es el alérgeno Alt a 1 de *Alternaria alternata*, debería de así mismo, conformar parte esencial del diagnóstico como marcador de ésta Familia taxonómica y extenderse estudios similares a otras fuentes de sensibilización fúngica como *Curvularia*, *Stemphylium*,.. que parecen mostrar un modelo similar al que exhibe *Ulocladium*.

VI. CONCLUSIONES

1.- Las especies de hongos que presentan una relevancia en nuestro entorno como fuentes de sensibilización son:

Deuteromycetes:

- Alternaria alternata*
- Aspergillus fumigatus*
- Cladosporium herbarum*
- Penicillium notatum*
- Ulocladium botrytis*
- Stemphiliium botryosum*

Levaduras:

- Candida albicans*

2.- La mayor relevancia en nuestro entorno como fuente de sensibilización es la especie *Ulocladium botrytis*. Se ha realizado la estandarización biológica sobre 26 pacientes específicamente sensibilizados del extracto alergénico de la especie de mayor relevancia *Ulocladium botrytis*.

3.- Se demuestra la posible categorización del alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, como alérgeno ortólogo, presente en las especies seleccionadas, con excepción de *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium notatum*.

4.-Se ha identificado molecularmente el alérgeno Alta1 en *Ulocladium botrytis*

5.- El alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata*, debería de ser considerado como un sensibilizante primario en la hipersensibilidad inmediata a hongos y en concreto entre los representantes de las Pleorosporeas.

6.- El alérgeno mayor Alt a 1 de *Alternaria alternata* representaría la herramienta diagnóstica de mayor valor en el diagnóstico de la sensibilidad a hongos, dado que la principal reactividad cruzada entre las especies de hongos es atribuible a dicho alérgeno.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aas, K., Backmann, A., Belin, L., y cols** (1978). Standardization of Allergen Extracts with Appropriate Methods. The Combined Use of Skin Prick Testing and Radio Allergosorbent Test. *Allergy*33:130-137.
- Aas, K., Leegaard, L. Aukrust, L. Grimmer, Q.** (1980). Immediate Type Hypersensitivity to Common Moulds. *Allergy*35:443-451.
- Abbas, A. K., Williams, M. E., Burstein, H. J., Chang, T. L., Bossu, P. y Lichtman, A. H.** (1991). Activation and Functions of CD4+ T-Cell Subsets. *Immunol Rev.*123:5-22.
- Abraham, S. N. y Arock, M.** (1998). Mast Cells and Basophils in Innate Immunity. *Semin Immunol.* 10:373-381.
- Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D., Breitenbach, M.** (1995). Molecular cloning of a major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol.* 32:213-227.
- Agarwal, M., Jones, RT., Yunginger, JW.** (1982). Shared Allergenic and Antigenic Determinants in *Alternaria* and *Stemphilium* Extracts. *J Allergy Clin Immunol.*70:437-444.
- Ainsworth GC, S. F., Sussman AS** (1973). The Fungy.A Taxonomic Review. Academic Press, London,4.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., Akdis, C. A.** (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific Tregulatory 1 and Thelper 2 cells. *J Exp Med.*199:1567-1575.
- Arnheim, N. y Southern, E. M.** (1977). Heterogeneity of the Ribosomal Genes in Mice and Men. *Cell*11:363-370.
- Aukrust, L., Borch, SM.** (1985). Cross Reactivity of Moulds. *Allergy* 40:57-60.
- Arruda, LK; Man, BJ; Chapman, MD.** (1992). Selective expression of a major allergen and cytotoxin, As p f 1, in *Aspergillus fumigatus*: Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus* related diseases. *J Immunol* 149:3354-3359.
- Baird, B., Sheets, ED., Holowka, D.,** (1999). How Does the Plasma Membrane Participate in Cellular Signaling by Receptors for Immunoglobulin E? *Biophys Chem*82:109-119.
- Barnes C, S. K., Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J.** (2000). Comparison of Outdoor Allergenic Particles and Allergen Levels. *Ann Allergy Asthma Immunol*84:47-54.

- Barnes, C., Buckley S., Pacheco, F., Portnoy J.** (2002). IgE-reactive proteins from *Stachybotrys chartarum*. *Ann Allergy, Asthma Immunology*. 88(1):29-33.
- Beaumont, F., Kauffmann, HF., deMonchy, JGR., Sluiter, HJ., de Vries, K.** (1985). Volumetric Aerobiological Survey of Conidial Fungi in the North-East Netherland. Ii. Comparison of Aerobiological Data and Skin Test with Mold Extracts in an Asthamtic Population. *Allergy* 46:99-104.
- Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D., de la Salle, C.,** (1992). Human Epidermal Langerhans Cells Express the High Affinity Receptor for Immunoglobulin E (Fc ϵ ri). *J Exp Med* 175:1285-1290.
- Biguet, J., Tran Van Ky, P., andrieu, S., Fruit, J.** (1964). Analise Immunoelectroforetique D'Extraits Celulaires Et De Milieu De Culture D'*Aspergillus Fumigatis* Par Des Immunoserums Experimentaux Et Des Serums Malades Attints D'*Aspergiloma* Broncopulmonaire. *Bulletin de la Societe Mycologique de France* 75:273-284.
- Bjomson, C. L., Mitchell, I., Adair, C., Green, F., Rose, M. S.** (2002). Chinook weather conditions, air pollution, and allergens: association with emergency rooms visits for asthma. *Proceedings American Thoracic Society*. 98 International Conference 2002. B39 poster E26.
- Black, P. N., Udy, A. A., Brodie, S. M.** (2000). Sensitivity to fungal allergen is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 55:501-504.
- Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H., Kinet, J.P.,** (1989). Complete Structure and Expression in Transfected Cells of High Affinity Ige Receptor. *Nature* 337:187-189.
- Bousquet, J.** (1998). Allergen Immunotherapy. Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. *Allergy*, 53: 1-42.
- Bradford, M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Ann Biochem* 72:248-254.
- Brasel, T.L., Douglas, D. R., Wilson S. C., Straus D. C.** (2005). Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Appl Environ Microb* 71, 114-122.
- Breitenbach, M., Achatz, G., Oberkofler, H., Simon, B., Unger, A., Lechenauer, E., Kandler, D., Ebner, C., Kraft, P.** (1995). Molecular Characterization of Allergens of *Cladosporium Herbarum* and *Alternaria Alternata*. *Int Arch Allergy and Immunol* 107:458-469.
- Breitenbach, M., Simon-Nobbe, B.** (2002). The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. *Chem Immunol* 81:48-72.

- Breitenbach, M., Simon-Nobbe, B., Denk, U., Scheneider, P., Richter, K., Teige, M., Radauer, C., Ebner, C., Nobbe, S., Schmid-Grendelmeier, P. Cramer, R.** (2005). Cloning, expression, characterization and skin prick testing of NADPH-dependent mannitol dehydrogenase. A new major allergen of *Cladosporium herbarum*. In: Lowenstein H, Bienenstock J, Ring J (Eds.). From Gene to Phenotypes - The Basis of Future Allergy Management. Cambridge, Hogrefe & Huber, pp:75-77.
- Brower, J.** (1996). Cross-Reactivity between *Aspergillus Fumigatus* Y *Penicillium*. *Int Arch Allergy Immunology* 110:166-173.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. y Wiley, D. C.** (1993). Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
- Burge, H. A., Solomon, H. R., Muilenberg, M. L.** (1982). Evaluation of indoor plantings as allergen exposure sources. *J Allergy Clin Immunol* 70:101-108.
- Burge, H. A.** (1992). Classification of the Fungi. *Clin Rev Allergy* 10:153-163.
- Bush, R., Sanchez, H., Geisler, D.,** (1999). Molecular Cloning of a Major *Alternaria Alternata* Allergen, Ralt a 2. *J Allergy Clin Immunol* 104:665-671.
- Busse, J. E. G. a. W. W.** (2002). Relationship of Viral Infections to Wheezing Illnesses and Asthma. *Nature reviews* 2:132-138.
- Calvo, M.A., Guarro, J., Suarez, G, Ramirez, C.** (1980). Air-borne fungi in Barcelona city (Spain). A two year study (1976-1978). *Mycopathologia* 71:89-93.
- Cantani, A., Businco, E., Maglio, A.** (1988). *Alternaria* Allergy: A Three Year Controlled Study in Children Treated with Immunotherapy. *Allergol et Immunopathol* 16:1-4.
- Cantani, A., Ciaschi, V.** (2004). Epidemiology of *Alternaria alternata* allergy: a prospective study in 6840 Italian asthmatic children. *Eur Rev Med Pharmacol Sc* 8:289-294.
- CDC:** Update: Pulmonary Hemorrhage/Hemosiderosis among infants - Cleveland, Ohio, 1993-1996. (2000) *JAMA* (19), 283:1951-1953.
- Codina, R., Fox, R., Lockey, R, DeMarco, P., Bagg, A.** (2008). Typical levels of airborne fungal spores in houses without obvious moisture problems during a rainy season in Florida, USA. *J Inv Allergol Clin Immunol* 18:156-162.
- Cole, G., Samson, R.A.** (1984). The Conidia. Mould allergy Y al-Doory and JF Domson Ch 5 Lea and Febiger Philadelphia, 66-103.
- Constant, S. L., Lee, K. S. y Bottomly, K.** (2000). Site of Antigen Delivery Can Influence T Cell Priming: Pulmonary Environment Promotes Preferential Th2-Type Differentiation. *Eur J Immunol* 30:840-847.

- Cookson, W. O., Moffatt, M.F.**, (2000). Genetics of Asthma and Allergic Disease. *Hum Mol Genet*9:2359–2364.
- Corsico, R., Cinti, B., Feliziani, V., Gallesio, M. T., Liccardi, G., Loreti, A.** (1998). Prevalence of sensitization to *Alternaria* in allergic patients in Italy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 80:71-76.
- Costa, J. J., Weller, P. F. y Galli, S. J.** (1997). The Cells of the Allergic Response: Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *JAMA*278:1815-1822.
- CHMP/BWP/304831/96** (2007). Guideline on Allergen Products: Production and Quality Issues. EMEA.
- Cramer, R., Blaser, K.** (1996). Cloning *Aspergillus fumigatus* allergens by the pJuFo filamentous phage display system. *Int Arch Allergy Appl Immunol*110:41-45.
- Cramer, R.** (1998). Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: From the nucleotide sequences to clinical applications 115:99-114
- Curran, I., Young NM., Burton, M., Vijay, HM** (1993). Purification and Characterization of Alt a-29 from *Alternaria alternata*. *Int Archives Allergy Immunology*102:267-275.
- D'Amato, G., Chatzigeorgiou, G., Corsico, R., Gioulekas, D., Jager, S., Kontou-Fili, K., Liccardi, G., Meriggi, A., Palma-Carlos, A., Palma-Carlos, M.L., Pagan Aleman, A., Parmiani, S., Puccinelli, P., Russo, M., Spieksma, F. T., Torricelli, R., Wolrich, B.** (1997). Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy. A european multicenter study promoted by the Subcommittee on Aerobiology and Environmental aspects of inhalant allergens of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*, 52:711-716.
- Datamonitor.**(2011). Informe Enfermedades Alérgicas.
- de Ana, S.G., Torres-Rodriguez, J.M., Belmonte-Soler, J.** (2006). Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*16(6):357-63
- Dreborg, S.** (1984). Skin Test Used in Type I Allergy Testing (Position Paper). *Allergy* 39:596-601.
- Downs, S. H., Mitakakis T. Z., Marks, G. B., Car, N. G., Belousova E. G., Leuppi J. D.** (2001). Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *Am J Respir Crit Care Med* 164:455-459.
- Durham I., Trowsdale L** (1987). Molecular Mapping of the Human Major Histocompatibility Complex by Pulse-Field Electrophoresis. *Proc Nat Acad Sci USA*84:7237-7241.

- Elidemir, O., Colasurdo, G., Rossmann S.** (1999). Isolation of *Stachybotrys* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. *Pediatrics* 104:964-966.
- Einarsson, R., Aukrust, L.** (1992). Allergens of the Fungi Imperfecti. *Clinical Reviews in allergy* 10:165-190.
- Environmental Protection Agency.** (2003) *A Brief Guide to Mold, Moisture and Your Home*. Washington, D. C. EPA Publication 402-K-02-003.
- Feijen, M., Gerritsen, J., Postma, D.S.,** (2000). Genetics of Allergic Disease. *Br Med Bull* 56:894-907.
- Feinberg, S.** (1935). Mold Allergy. Its Importance of Asthma and Hay Fever. *Wisconsin Medicine Journal* 34:254-257.
- Flappan, S. M., Portnoy, J., Jones, P., Barnes, C.** (1999). Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with damage a mold (*Stachybotrys atra* (*chartarum*)). *Environmental Health Perspectives* 107:927-930.
- Folkerts, G., Walzl, G., Openshaw, P.J.,** (2000). Do Common Childhood Infections 'Teach' the Immune System Not to Be Allergic? *Immunol Today* 21:118-120.
- Galli, S. J., Maurer, M. y Lantz, C. S.** (1999). Mast Cells as Sentinels of Innate Immunity. *Curr Opin Immunol* 11:53-59.
- Garman, S. C., Kinet, J.P., Jardetzky, T.S.,** (1998). Crystal Structure of the Human High-Affinity IgE Receptor. *Cell* 95:951-961.
- Gell, K., Burge, H., Muilenberg, M., Sweet, T.** (1992). Skin test reactivity to *Penicillium* (PEN) and *Alternaria* (ALT) extracts. *J Allergy Clin Immunol* (Abstract), 552:282.
- Gershoni, J. M. y Palade, G. E.** (1983). Protein Blotting: Principles and Applications. *Anal Biochem* 131:1-15.
- Gravesen, S., Frisvad, JC, Samson, RA** (1994). *Microfungi*. Munksgaard Copenhagen.
- Gravesen, S., Nyholm, C.** (1983). Common Major Allergen in *Alternaria* and *Ulocadium*. *Folia Alergol Immunol Clinica* 80:669-679.
- Greenberger, PA.** (1988). Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and fungoses. *Clin Chest Med* 9:599-608.
- Gregory, P.** (1973). *Microbiology of the Atmosphere*. L Hill Aylesbury.
- Grunewald, S. M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein, C. E., Brocker, E. B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W. y Duschl, A.** (1998). An Antagonistic Il-4 Mutant Prevents Type I Allergy in the Mouse: Inhibition of the

Il-4/Il-13 Receptor System Completely Abrogates Humoral Immune Response to Allergen and Development of Allergic Symptoms in Vivo. *J Immunol*160:4004-4009.

Halonen, M., Stern D. A., Wright A. L., Taussig, L. M., Martínez F. D. (1997). *Alternaria* is a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1356-1361.

Harris, L. (1940). Experimental Reproduction of Respiratory Mould Allergy. *J Allergy Clin Immunol*14:279-282.

Hawksworth DL, K. P., Sutton BC, Pegler DN (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* 8° ed CAB International, Wallingford.

Hemmann, S., Blaser, K., Cramer, R. (1997). Allergens of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes. *American J Resp Crit Care Medicin* 156:1956-1962.

Hemmann, S., Ismail, C., Blaser, K., Cramer, R. (1998). Skin-test reactivity and isotype-specific immune response to recombinant Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy* 28:860-867.

Hiller, R. e. a. (2002). Microarrayed Allergen Molecules:Diagnostic Gatekeepers for Refined Allergy Treatment. *FASEB J*Jan 14 (DOI 10.1096/fj.01-0711fje).

Holgate, S. T., Church, M (1993). *Allergy*Gower medical Publishing. Londres.

Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B., Pryor, B. M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* 42:119-129.

Horner, W., Helbling, A., Salvaggio, JE., Lehrer, SR. (1995). Fungals Allergens. *Clin Microbiol Rev* 8:161-179.

Horst, M., Hejjaoui, A., Horst, V., michel, F.B., Bousquet. (1990). Double Blind Placebo Controlled Rush Immunotherapy with a Standarized *Alternaria* Extract. *J Allergy Clin Immunol*85:460-472.

Infante, F., Galán C., Domínguez, J., Angulo, J., Mediavilla, A. (1992). Air spore microfungi in dwellings of South of Spain. *Aerobiol* 8 (2):245-253.

Infante, F. (1997). Caracterización aerobiológica de los principales hongos de interior. *Rev Portuguesa Immunoalergol* 5(2):108-115.

Infante, F., Alba, F., Caño, M., Castro, A., Domínguez, E., Méndez, J., Vega, A. (1999). A comparative study of the incidence of *Alternaria* conidia in the atmosphere of five spanish cities. *Polen* 10:05-13.

Jongepier, H., Boezen, H. M., Dijkstra, A., Howard, T. D., Vonk, J. M., Koppelman, G. H., Zheng, S. L., Meyers, D. A., Bleecker, E. R. y Postma,

- D. S.** (2004). Polymorphisms of the Adam33 Gene Are Associated with Accelerated Lung Function Decline in Asthma. *Clin Exp Allergy*34:757-760.
- Kaad, P., Ostergaard, PAA.** (1982). The Hazard of Mould Hyposensitization in Children with Asthma. *Clin Allergy*12:317-320.
- Karlsson-Borga, A., Jonsson, P., Rolfsen, W.** (1989). Specific Ige Antibodies to 16 Widespread Mold Genera in Patients with Suspected Mold Allergy. *Ann Allergy*63:521-526.
- Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S. G. y Trowsdale, J.** (1991). A New Human Hla Class II-Related Locus, Dm. *Nature*353:571-573.
- Kim, S., Chaparas, SD.** (1979). Characterization of Antigens from *Aspergillus fumigatus*. Iii. Comparison of Antigenic Relationships of Clinically Important Aspergilli. *American Review of Respiratory Disease*120:1297-1303.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A.** (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* (10 Ed.). Wallingford, Cabi.
- Koivikko, A.** (1983). Patient Exposure to Moulds. Mould allergy workshop Foucard T & Dreborg S *Upssala*:35-41.
- Kumar, A., Kurup, VP., Greenberger, PA., Fink, JN.** (1993). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody to a Major Concanavalin a-Nonbinding Antigen of *Aspergillus Fumigatus*. *Journal of Laboratory and Clin Medicine*121:431-436.
- Kurth R.** (1990). *Regulatory control and standarization of allergenic extracts.* Gustav Fisher Verlag, New York.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *227*:680-685.
- Lai, H. Y. L., Tam, M. F., Tang, R. B., Chou, H., Chang, C. Y., Tsai, J. J., Shen, H. S.** (2002). cDNA cloning and immunological characterization of a newly identified enolase allergen from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus*. *Int Arch Allergy Immunol* 127:181-190.
- La Serna, I., Dopazo, A., Aira M. J.** (2002). Airbone fungal spores in the campus of Anchieta (La Laguna, Tenerife/Canary Is.). *Grana* 41:119-123.
- Leino, M., Alenius, H. T., Fyhrquist-Vanni, N., Wolff, H. J., Reijula, K. E., Hintikka, E. L., Salkinoja-Salonen, M. S., Haahtela, T., Mäkelä, M.** (2005). Intranasal exposure to *Stachybotrus chartarum* enhances airway inflammation in allergic mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 173:512-518.
- Lelong, M., Henard, J., Wattre, P., Duprey, J., Thelliez, P., Miersman, R.** (1985). Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 76:819-825.

- Licorish, K., Novey, H., Kozak, P., Fairshter, RD., Wilson, AF.** (1985). Role of *Alternaria* and *Penicillium* Spores in the Pathogenesis of Asthma. *J Allergy Clin Immunol*76:819-825.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., Robinson, D., S.** (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of allergen-drive T cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
- Lopez, M. S., JE** (1985). Mold-Sensitive Asthma. *Clin Rev Allergy*3:183-196.
- Mayer, C., Appenzeller, U., Seelbalch, H., Achatz, G., Oberkofler, H., Breitenbach, M., Blaser, K., Cramer, R.** (1999). Humoral and cell-mediated autoimmune reactions to human acidic ribosomal P2 protein in individuals sensitized to *Aspergillus fumigatus* P2 protein. *J Exp Med* 189:1507-1512.
- Malling, H.** (1987). Skin Prick Test: Methodological Studies and Clinical Applications. Linköping University Medical Dissertation n° 239.
- Malling, H. J.,** (1992). Immunotherapy for Mold Allergy. *Clin Rev Allergy*10:237-251.
- Malling, H. J., Dreborg, S., Weeke, B.** (1986). Diagnosis and Immunotherapy in Mould Allergy. iii. Diagnosis in *Cladosporium* Allergy by Means of Symptom Score, Bronchial Provocation Test, Skin Prick Test, Rast, Crie and Histamine Release. *Allergy*41:57-67.
- Malling, H. J., Dreborg, S., Weeke, B.** (1987). Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. iv. Ig-mediated Parameters During a One Year Placebo Controlled Study of Immunotherapy with *Cladosporium*. *Allergy*42:305-314.
- Malling, H. J., Agrell, B., Croner, S., Dreborg, S., Foucard, T., Kjelman, M., Koivikko, A., Roth, A., Weeke, B.** (1985). Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. I. Screening for Mould Allergy. *Allergy*40:108-114.
- Malling, H. J., Skov, PS.,** (1988). Diagnosis and Immunotherapy in Mold Allergy. viii. Qualitative and Quantitative Estimation of IgE in *Cladosporium* Immunotherapy. *Allergy*43:228-238.
- Martinez, J.** (1986). Relaciones Huesped Parasito En La Aspergillosis Aviar. Estudio De La Respuesta Inmune Humoral De Columbia Limbia Frente a La Inmunización Con Antigenos Aspergilaes Y De Sus Respuesta Histologica En La Infección Experimental.Consideraciones Epidemiologicas. Tesis doctoral Barcelona.
- Martinez, J., Martinez, A., Gutierrez, G., Llamazares, A., Palacios, R., Saenz de Santamaria, M.,** (1994). Influencia del Proceso de Obtencion en la actividad alergenica y rendimiento de extractos de *Alternaria alternata*. *RIM* 11:13.

- McFadden, E. R., Jr. y Gilbert, I. A.** (1992). Asthma. *N Engl J Med* 327:1928-1937.
- Melen, E., Pershagen, G.** (2012). Pathophysiology of asthma: lessons from genetic research with particular focus on severe asthma. *J Inter Med* 272(2):108-20.
- Metcalfe, D. D., Baram, D. y Mekori, Y. A.** (1997). Mast Cells. *Physiol Rev* 77:1033-1079.
- Meyers, D.A.** (2010). Genetic of asthma and allergy: what have we learned?. *J Allergy Clin Immunol* 126(3):439-46
- Mishra, S., Ajello, L., Ahearn, DG., Burge, HA., Kurup, VP., Pierson, DL., Price, DL., Samson, RA., Sandhu, RS., Shelton, B., Simmons, RB., Switzer, KF** (1992). Enviromental Mycology and Its Importance to Public Health. *J Med Veterin Mycology* 30:287-305.
- Mitakakis, T., Barnes, C., Tovey, ER.** (2001). Spore Germination Increases Allergen Release from *Alternaria*. *J Allergy Clin Immunol* 107:388-390.
- Mudde, G. C., Van Reijsen, F. C., Boland, G. J., de Gast, G. C., Bruijnzeel, P. L. y Bruijnzeel-Koomen, C. A.** (1990). Allergen Presentation by Epidermal Langerhans' Cells from Patients with Atopic Dermatitis Is Mediated by IgE. *Immunol* 69:335-341.
- Muilenberg M, Burge H, Sweet T, Solomon W.** (1990). *Penicillium* species in and out of doors in Topeka (Kansas). *J Allergy Clin Immunol* 85: 247.
- Nag, A., Monine, M.I., Goldstein B.** (2010). A detailed mathematical model predicts that serial engagement of IgE-Fc epsilon RI complexes can enhance Syk activation in mast cells. *J Immunol* 185(6):3268-76
- Neukirch, C., Henry, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F.** (1999). Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma?. A population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 103:709-711.
- Nilsson, D.** (1983). General Biology Collecting Methods and Prevalence of Moulds in Europe. Mould allergy workshop Foucard, t & Dreborg, S Upsala: 13-34.
- Nilsson, D., Aas, K.** (1978). Immunological Specific and Correlation of Diagnostic Test for Bronchial Allergy to *Cladosporium Herbarum*. *Acta Ped Scand* 65:33-38.
- Nyholm, L., Lowenstein, H, Yunyinger, JW** (1983). Immunochemical Partial Identity between Two Independently Identified and Isolated Major Allergens from *Alternaria Alternata* (Alt-1, Ag1). *J Allergy Clin Immunol* 71:461-467.

- O'Neil, C., Reed, MA., Hugges, JM., Butcher, BT., Lehrer, SB.,** (1987). *Fusarium Solani* Evidence for Common Antigenic-Allergenic Determinants with Other Fungi Imperfecti. *Clin Allergy* 17:127-133.
- O'Hollaren MT, Y. J., Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, et al.** (1991). Exposure to an Aeroallergen as a Possible Precipitating Factor in Respiratory Arrest in Young Patients with Asthma. *N Engl J Med* 324:359-363.
- Olonitola, P., Dada, JD., Galadima, M., Odama, LE.** (1994). Fungal Spores in the Homes Asthmatic Patients in Zaria, Nigeria. *Ann Allergy* 73:273-274.
- Osterballe, O., Week, B.** (1979). A New Lancet for Skin Prick Testing. *Allergy* 34:209-212.
- Ostergaard, P., Kaad, PH., Kristensen, P.** (1986). A Prospective Study on the Safe of Immunotherapy in Children with Severe Asthma. *Allergy* 41:588-593.
- Palacios, R., Gárate, A. M., Ruíz-Bravo, C.** (1986). Caracterización bioquímica y estandarización inmunológica de los antígenos fúngicos. Libro Ponencias XV Congreso Nacional Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica. 119-127
- Palm, N. W.; Rosenstein, R. K., Medzhitov R.** (2012). Immunology: Allergy challenged. *Nature* 484, 465-72.
- Patterson R.** (1985). Allergic diseases. J. B. Lippincott Co. Philadelphia.
- Perzanowsky, M. S., Sporik, R., Squillace, S. P., Gelber, L. E., Call, R., Carter, M.** (1998). Association of sensitization to *Alternaria* allergens with asthma among school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 101:626-632.
- Paul, W. E., Seder, R. A. y Plaut, M.** (1993). Lymphokine and Cytokine Production by Fc Epsilon Ri+ Cells. *Adv Immunol* 53:1-29.
- Pineda F.** (2005). Expresión y purificación del alérgeno Alt a 1 de *Alternaria alternata*. Implicación en la hipersensibilidad tipo I. Memoria Tesis Doctoral Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. Madrid.
- Ponton, J., Moragues, M. D., Gené, J., Guarro, J., Qunidós, G.** (2002). Hongos y actinomicetos alérgicos. *Rev Ibéroamericana Micología*. ISBN:84-607-5370-0.
- Potaczek, D.P., Kabesch, M.** (2012). Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clin Exp Allergy* 42(6):852-71
- Prince, H. S., WA; Morrow, MB.** (1934). Molds in the Ethiology of Asthma and Hay Fever. *State Journal of Medicine* 30:340-344.
- Pulendran, B., Artis D.** (2012). New paradigms in type 2 immunity. *Science* Vol 337. 431-435.

Quindos, G., Severo, LC., Knight, F., Ponton, J., Hearn, V., McKenzie, DWR (1993). Antigenic Cross-Reactivity between *Candida Albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *IMMUNOLOGY* 79:79-82.

Rao, C. Y. (2000). Toxicogenic fungi in the indoor environment, p. 46.1-46.19. In J. D. Spengler, J. M. Samet and J. F. McCarthy (ed.), *Indoor air quality handbook*. McGraw-Hill, Washington, D.C.

Resano, A., Sanz, M.L., Oheling, A. (1998). Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in asthmatic patients and its in vitro diagnostic confirmation. *J Invest Allergol Clin Immunol* 8(6):353-358.

RFE (1997). 2.5.12; Determinación De Agua: Semimicrodeterminación. 68.

Robert K. Bush, M., and Jay J. Prochnau, MD (2004). *Alternaria*-Induced Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 113:227-234.

Romagnani, S. (1997). Atopic Allergy and Other Hypersensitivities Interactions between Genetic Susceptibility, Innocuous and/or Microbial Antigens and the Immune System. *Curr Opin Immunol* 9:773-775.

Romagnani, S. (2004). Immunologic Influences on Allergy and the Th1/Th2 Balance. *J Allergy Clin Immunol* 113:395-400.

Saini, S. S., Klion, A. D., Holland, S. M., Hamilton, R. G., Bochner, B. S. y Macglashan, D. W., Jr. (2000). The Relationship between Serum IgE and Surface Levels of FcεR1 on Human Leukocytes in Various Diseases: Correlation of Expression with FcεR1 on Basophils but Not on Monocytes or Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 106:514-520.

Savilhati, R., Uitti, J., Laippala, P. (2000). Respiratory morbidity among children following renovation of a water-damage school. *Arch Environ Health* 55:405-410.

Savilhati, R., Uitti, J., Roto, P. (2001). Increased prevalence of atopy among children exposed to mold in a school building. *Allergy* 56:175-179.

Schafer-Nielsen, C., Svendsen, P. J. y Rose, C. (1980). Separation of Macromolecules in Isotachopheresis Systems Involving Single or Multiple Counterions. *J Biochem Biophys Methods* 3:97-128.

Shen, H.D., Lin, W.L., Tsai, J.J., Han, S.H. (1996). Allergenic Components in Three species of *Penicillium*. Cross-Reactivity among Major Allergens. *Clin Exp Allergy* 26:444-451.

Shen H.D., Lin, W.L., Liaw, S.F., Tarn, M.F., Han, S.H. (1997). Characterization of the 33-kilodalton major allergen from *Penicillium citrinum* by using MoAbs and N-terminal amino acid sequencing. *Clin Exp Allergy* 27: 89-86.

- Shen, H.D., Wang, SR., Tang, RB. y cols** (1988). Identification of Allergen and Antigen of Bermuda-Grass Pollen by Immunoblot Analysis. Clin Allergy 18:401-410.
- Shen, H. D., Lin, W. L., Tam, M. F., Wang, S. R., Tzean, S. S., Huang, M. H., Han, S. H.** (1999). Characterization of allergen from *Penicillium oxalicum* and *Penicillium notatum* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. Clin Exp Allergy 29:642-651.
- Shen, H. D., Ming, F. T., Tang, R. B., Chou, H.** (2007). *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. Current Allergy Asthma Reports, 7:351-356.
- Shevchenko A, Tomas H, Vorm O, Havlis J, Olsen JV, Mann M.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1:2856-60.
- Simon-Nobbe, B., Probst, G., Kajava, A. V., Oberkofler, H., Susani, M., Cramer, R., Ferreira, F., Ebner, C., Breitenbach, M.** (2000). IgE-binding epitopes of enolases, a class of highly conserved fungal allergens. J Allergy Clin Immunol, 106:887-895.
- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M.** (2008). The spectrum of fungal allergy. Int Arch Allergy Immunol 145:58-86
- Smith, D. H., Malone, D.C., Lawson, K.A., Okamoto, L.J., Battista, C., Saunders, W.B.** (1997). A National Estimate of the Economic Costs of Asthma. Am J Respir Crit Care Med 156:787-793.
- So, A.** (1994). Genetics, Polymorphism and Regulation of Expression of HLA Region Genes. HLA and Disease. Lechler (Ed) San Diego, CA Academic Press Inc.
- Solomon, WR, Matthews, KP.** (1989). Aerobiology and inhalant allergens: In Allergy Principles and Practice, 3rd. ed. (Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, eds.). St. Louis: C.V. Mosby: 312-372.
- Sood, A.** (2012). Indoor fuel exposure and the lung in both developing and developed countries: an update. Clin Chest Med 33(4):649-665
- Spector, S., Farr, R.** (1979). Bronchial Inhalation Challenge With Antigens. J Allergy Clin Immunol 64:580-586.
- Spinoza, F.A., Weter, M.J., Oliver, J.M., Wilson B.S., Steinberg, S.L.** (2012). Insights into cell membrane microdomain organization from live cell single particle tracking of the IgE high affinity receptor Fc epsilon RI of mast cells. Bull Math Biol 74(8):1857-911
- Steringer, Y., Aukrust, L., Einarsson, R.** (1987). Variability of Antigenicity/Allergenicity in Different Strains of *Alternaria alternata*. Int Arch Allergy Immunol 84:190-197.

- Stolwijk J. A. J.** (1991). Sick-building-syndrome. *Environ Health Perspect*; 95: 99-100.
- Targonski, P. V., Persky, V. W., Ramekrshnan, V.** (1995). Effect of enviromental molds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 95:955-961.
- Tarlo, S., fradkin, A. Tobin, RS.**(1988). Skin Testing with Extracts of Fungal Species Derived from the Homes of Allergic Clinic Patients in Toronto, Canada. *Clin Allergy*18:45-52.
- Tee, R., Gordon, DJ., Taylor, AJN.,** (1987). Cross-Reactivity between Antigens of Fungal Extracts Studied by Rast Inhibiton and Immublot Technique. *J Allergy Clin Immunol*79:627-633.
- Torres Rodriguez JM, M. Q. J.** (1984). Micosis Que Afectan a La Piel Y Mucosas. Doyma, Barcelona, 1-11.
- Torres Rodriguez JM., M. Q. J., Corominas Sanchez., Acebillo J.** (1982). Identificación y distribución de hongos atmosfericos intra y extradomiciliarios en Barcelona por medio de cultivo en placa. XII Congreso de la SEAIC Sevilla Libro de ponencias y comunicaciones Madrid. 479-482.
- Turner, H. y Kinet, J. P.** (1999). Signalling through the High-Affinity IgE Receptor Fc Epsilonri. *Nature*402:24-30.
- Valenta, R. e. a.** (1991). Identification of Profilin as a Novel Pollen Allergen; IgE Autoreactivity in Sensitized Individuals. *Science* 253:557-560.
- Valenta, R., Dietrich, K.** (2002). From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 14: 718-727.
- Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K. y cols.** (2002). Association of the Adam33 Gene with Asthma and Bronchial Hyperresponsiveness. *Nature*418:426-430.
- van Ree, R.** (2000). A New Start for Allergen References and Standarzitation Based on Purified (Natural and Recombinant) Allergens Nd Monoclonal and Monospecific Polyclonal Antibodies. *Regulatory Control and standarzitation of allergenic extracts Darsmstadt, Germany: GIT Verlag*, 87-92.
- van Ree, R. y Aalberse, R. C.** (1999). Specific Ige without Clin Allergy103:1000-1001.
- van Ree, R., Van Leeuwen WA, Aalberse RC** (1998). How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy? A study with 17 pollen extracts and purified natural and recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol*102(2):184-190.

van Ree, R. e. a. (1996). False-Positive Skin-Prick Test Responses to Commercially Available Dog-Dander Extracts Caused by Contamination with House Dust Mite Dermatophagoides Pteronyssinus) Allergens. J Allergy Clin Immunol98:1028-1034.

Viana, M. E., Coates, N. H., Gavett, S. H., Selgrade M. J. K, Vesper, S. J., Ward M. D. W. (2002). An extract of *Stachybotrys chartarum* causes allergic asthma-like responses in BALB/c mouse model. Toxicological Sciences 70:98-109.

Vijay, H. M., Thaker, A. J., Banerjee, B., Kurup, W. P. (1999). Mold Allergens. Allergen and Allergen Immunotherapy 2nd Edition. Marcel Dekker Inc. 133-154.

Vijay, H. M., Kurup, V. P. (2004). Fungal allergens. Clinical Allergy and Immunology. Vol 18. Allergens and Allergen Immunotherapy. Marcel Dekker Inc. 223- 249.

Verma, J., ganagal, SV., (1994). Studies of *Fusarium solani*. Cross-reactivity among *Fusarium* species. Allergy49:330-336.

Vesper, S. J., Vesper, M. J. (2002). Stachylisi may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. Infection and Immunity 70:2065-2069.

von Hertzen, L. C. (2000). Puzzling Associations between Childhood Infections and the Later Occurrence of Asthma and Atopy. Ann Med32:397-400.

Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C. P. y Guggenmoos-Holzmann, I. (1997). Indoor Allergen Exposure Is a Risk Factor for Sensitization During the First Three Years of Life. J Allergy Clin Immunol 99:763-769.

Wardlaw, A. J., Moqbel, R. y Kay, A. B. (1995). Eosinophils: Biology and Role in Disease. Adv Immunol60:151-266.

Webber, K., Osborn, H. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Eelectrophoresis. J Biol Chem244:4406-4411.

Wills-Karp, M., Santeliz, J. y Karp, C. L. (2001). The Germless Theory of Allergic Disease: Revisiting the Hygiene Hypothesis. Nat Rev Immunol1:69-75.

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G. y van Ree, R. (2002).Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. Science296:490-494.

Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C.J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B., (1997). Expression of IL-4 and IL-5 Mrna and Protein Product by Cd4p and Cd8p T cells,

eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 158:3539-3544.

Yunginger, J. W., Jones, R.T., Nesheim, M.E., Geller, M. (1980). Studies on *Alternaria* Allergens. III Isolation of a major allergenic fraction (Alt-I). *J Allergy Clin Immunol* 66:138-147.

Zock, J.P. (2002). Housing characteristics, reported mold exposure and asthma in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 110(2):285-92

Zureik, M., Neukirch, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F. (2002). *European Community Respiratory Health Survey*. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ* 325:411-414.